



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTI-PROLIFERATIVOS DE FÁRMACOS INIBIDORES DE
TOPOISOMERASES DO TIPO II EM PROMASTIGOTAS DE *LEISHMANIA INFANTUM*

SUSANA MARIA GOMES FRANCO

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor José António Mestre Prates

ORIENTADOR

Doutora Isabel Maria Soares Pereira da
Fonseca

Doutor Fernando António da Costa
Ferreira

Doutora Gabriela Maria Santos-Gomes

CO-ORIENTADOR

Doutor Fernando António da Costa
Ferreira

Doutora Gabriela Maria Santos-Gomes

2013

LISBOA



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTI-PROLIFERATIVOS DE FÁRMACOS INIBIDORES DE
TOPOISOMERASES DO TIPO II EM PROMASTIGOTAS DE *LEISHMANIA INFANTUM*

SUSANA MARIA GOMES FRANCO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor José António Mestre Prates

ORIENTADOR

Doutora Isabel Maria Soares Pereira da
Fonseca

Doutor Fernando António da Costa
Ferreira

Doutora Gabriela Maria Santos-Gomes

CO-ORIENTADOR

Doutor Fernando António da Costa
Ferreira

Doutora Gabriela Maria Santos-Gomes

2013

LISBOA

DECLARAÇÃO

Nome: Susana Maria Gomes Franco

Endereço eletrónico: franco.susana@hotmail.com

Telefone: 968403440

Número do Bilhete de Identidade: 13253093 7 ZZ7

Título: Avaliação dos efeitos anti-proliferativos de fármacos inibidores de topoisomerasas do tipo II em promastigotas de *Leishmania infantum*

Orientador: Doutor Fernando António da Costa Ferreira

Co-orientadora: Doutora Gabriela Maria Santos-Gomes

Ano de conclusão: 2013

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Faculdade de Medicina Veterinária da UTL, 5 de Junho de 2013

Assinatura:

A handwritten signature in blue ink that reads "Susana Maria Gomes Franco". The signature is written in a cursive, flowing style.

(Susana Maria Gomes Franco)

À minha Mãe.

“A ciência será sempre uma busca e jamais uma descoberta.
É uma viagem, nunca uma chegada.”

Karl Popper

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Professor Doutor Fernando Ferreira pela simpatia e compreensão, mas sobretudo pelo ânimo e apoio que me prestou enquanto orientador deste estudo.

À Professora Doutora Gabriela Santos-Gomes pela amabilidade de ter aceitado ser minha co-orientadora, pela paciência e pelos sábios conselhos.

À Professora Doutora Isabel Pereira da Fonseca pela sua generosidade, sabedoria e simpatia.

À Dr.^a Lúcia Gomes pelo apoio prestado e pelos ensinamentos transmitidos.

Também quero agradecer à Dr.^a Belmira Carrapiço e à Professora Berta São Braz por me terem acolhido no Laboratório de Farmacologia e Toxicologia.

Ao Octávio pelos conhecimentos que me transmitiu, pela amizade, gentileza e disponibilidade ao longo destes últimos anos.

À Margarida Simões, à Cátia Marques e aos restantes colegas do Laboratório de Parasitologia que foram sempre muito prestáveis.

À minha mãe e ao Fernando por terem estado sempre carinhosamente a meu lado, transmitindo alento e coragem e por tornarem possível a realização deste curso. Ao meu pai pela compreensão, acompanhamento e apoio.

A todos os meus amigos e colegas que durante este percurso acreditaram em mim, me impulsionaram e ampararam nos momentos mais conturbados. Em particular, à Ana, à Angelina e à Eunice.

Ao Hugo por ter contribuído direta e indiretamente para a conclusão desta etapa e por ter resistido às minhas ausências e exigências.

Ao meu pequenito Charlie.

Palavras-chave: *Leishmania infantum*, Leishmaniose, topoisomerase II, fluoroquinolonas.

A Leishmaniose canina é uma doença endémica e de elevada incidência em Portugal. O arsenal farmacológico disponível não permite a cura parasitológica, causa efeitos tóxicos graves no organismo e os protocolos terapêuticos são onerosos. De forma a aumentar o leque de alternativas no combate a este protozoário foram avaliados os efeitos inibitórios das fluoroquinolonas em promastigotas de *Leishmania infantum*. Esta família de antibióticos são inibidores de topoisomerasas de tipo II, enzimas fundamentais para o metabolismo dos ácidos nucleicos bacterianos.

Neste estudo foi analisado, *in vitro*, o efeito anti-proliferativo de um conjunto de fluoroquinolonas comerciais (quatro gerações), visando várias concentrações (0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M e 100 μ M), em promastigotas de *L. infantum*. Esta análise foi realizada através de um ensaio colorimétrico de viabilidade celular e, paralelamente, por observações e contagens ao microscópio ótico, sendo os resultados confrontados com um controlo positivo (antimoniato de meglumina). Os resultados obtidos foram também comparados com os resultados obtidos a partir de culturas de promastigotas não tratados (controlo negativo). Após a análise dos resultados, as fluoroquinolonas de terceira e quarta geração, particularmente a levofloxacina, a clinafloxacina e a garenoxacina, foram das fluoroquinolonas estudadas, as que mostraram maior efeito citotóxico sobre o parasita.

Desta forma, o uso de fluoroquinolonas poderá vir a constituir uma abordagem terapêutica promissora para a Leishmaniose canina, também por estas apresentarem uma menor propensão para o desenvolvimento de resistências, uma menor toxicidade e um custo inferior relativamente aos fármacos atualmente utilizados.

ABSTRACT

Keywords: *Leishmania infantum*, Leishmaniosis, topoisomerase II, fluoroquinolones.

In Portugal, canine Leishmaniosis is an endemic disease with a high incidence. The available drugs do not enable the complete heal, besides being onerous and their inherent toxic effects. In order to broaden the range of alternatives applicable to the treatment of this disease, *Leishmania infantum* promastigotes were exposed to some commercial fluoroquinolones to establish their cytotoxic effect. Fluoroquinolones are a family of antibiotics that inhibit the action of topoisomerase II in bacteria. These enzymes are essential for nucleic acids metabolism, also in eukaryotes.

This study aims to determine the antiproliferative effect of a set of commercial fluoroquinolones, including 1st, 2nd, 3rd and 4th generation, incubating several concentrations (0.1, 1, 10 and 100 µM) on *L. infantum* promastigotes. The cellular viability was evaluated through a colorimetric MTS assay in comparison to untreated parasites (negative control) and parasites treated with meglumine antimoniate (positive control). At the same time, daily observations and counts at the microscope were carried out.

The results demonstrated that fluoroquinolones of third and fourth generation, as levofloxacin, clinafloxacin and garenoxacin, did reveal a strong cytotoxic effect. Therefore, fluoroquinolones can represent an important advantage in the treatment of canine Leishmaniosis, as they are less prone to resistance development, less toxic and less expensive than currently used drugs.

COMUNICAÇÕES ORAIS EM REUNIÕES CIENTÍFICAS

- FRANCO, S., PEREIRA, O., ALEXANDRE-PIRES, G., PEREIRA DA FONSECA, I., SANTOS-GOMES, G., FERREIRA, F. (2012) - Avaliação de fármacos inibidores de topoisomerase II em promastigotas de *Leishmania infantum* – novas abordagens terapêuticas em leishmaniose canina. “III Encontro de Formação da OMV e XIII Congresso de Medicina Veterinária em Língua Portuguesa”, organizado pela OMV, em Lisboa, Portugal, 17 e 18 de novembro.
- FRANCO, S., PEREIRA, O., PEREIRA DA FONSECA, I., SANTOS-GOMES, G., FERREIRA, F. (2012) - Efeito leishmanicida do ácido nalidixico, enrofloxacina e levofloxacina comparativamente ao antimoniato de meglumina, em culturas de promastigotas de *L. infantum*. “XVI Congresso Português de Parasitologia”, organizado pela Sociedade Portuguesa de Parasitologia, em Lisboa, Portugal, 29 e 30 de novembro.

ARTIGOS EM REVISTAS CIENTÍFICAS NACIONAIS COM ARBITRAGEM CIENTÍFICA

- FRANCO, S., PEREIRA, O., PEREIRA DA FONSECA, I., SANTOS-GOMES, G., FERREIRA, F. (2012). Análise da citotoxicidade de fluoroquinolonas em promastigotas de *Leishmania infantum*. Acta Parasitológica Portuguesa, ISSN 0872-5291, Vol. 19, No. 1/2, pp. 25-30.

RESUMOS DE COMUNICAÇÕES EM ATAS DE ENCONTROS CIENTÍFICOS

- FRANCO, S., PEREIRA, O., PEREIRA DA FONSECA, I., SANTOS-GOMES, G., FERREIRA, F. (2012). Efeito leishmanicida do ácido nalidixico, enrofloxacina e levofloxacina comparativamente ao antimoniato de meglumina, em culturas de promastigotas. Acta Parasitológica Portuguesa, ISSN 0872-5291, Vol. 19, No 1/2, pp 102-103

AGRADECIMENTOS.....	i
RESUMO	ii
ABSTRACT	iii
TRABALHOS APRESENTADOS OU PUBLICADOS	iv
ÍNDICE GERAL	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xi
I. BREVE DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES DE ESTÁGIO	1
II. INTRODUÇÃO.....	2
III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
1. <i>Leishmania</i>	4
1.1. Breve referência histórica.....	4
1.2. Taxonomia.....	4
1.3. Biologia	5
1.3.1. Ciclo de vida	6
1.3.2. Hospedeiros Reservatórios.....	8
1.3.3. Vetor.....	9
1.3.4. Outros modos de transmissão	13
1.4. Replicação do ADN cinetoplastidial – a importância das topoisomerases	14
1.4.1. Classificação das topoisomerases	14
1.4.2. Estrutura das topoisomerases	16
1.4.3. Topoisomerases como alvos terapêuticos nos protozoários	20
1.4.4. Classificação dos inibidores de topoisomerases	20
1.4.5. Análise filogenética.....	21
2. Leishmaniose.....	23
2.1. Epidemiologia	24
2.2. Patogénese e lesões	28
2.2.1. Lesões cutâneas.....	29
2.2.2. Lesões oculares	30
2.2.3. Lesões renais	30
2.2.4. Lesões do sistema musculoesquelético.....	31
2.2.5. Lesões dos linfonodos, baço e medula óssea	31
2.3. Resposta imunitária	33
2.3.1. Fatores predisponentes.....	35
2.3.2. Imunidade Celular.....	35
2.3.3. Imunidade Humoral	37
2.4. Mecanismos de evasão de <i>Leishmania</i>	37
2.5. Diagnóstico.....	38
2.5.1. História clínica e exame físico	38
2.5.2. Exames laboratoriais para parâmetros biológicos inespecíficos.....	38
2.5.3. Diagnóstico parasitológico.....	39
2.5.4. Diagnóstico molecular	39
2.5.5. Diagnóstico serológico.....	40

2.6. Terapêutica.....	43
2.7. Profilaxia.....	46
2.8. Resistências.....	48
2.9. Prognóstico	48
2.10. Saúde Pública.....	50
3. Fármacos inibidores irreversíveis de topoisomerases - fluoroquinolonas.....	51
3.1. Estrutura e espectro de ação	52
3.1.1. Ácido nalidíxico	56
3.1.2. Ciprofloxacina	56
3.1.3. Difloxacina	57
3.1.4. Enoxacina	57
3.1.5. Enrofloxacina	58
3.1.6. Fleroxacina	58
3.1.7. Lomefloxacina.....	58
3.1.8. Balofloxacina.....	59
3.1.9. Danofloxacina.....	59
3.1.10. Grepafloxacina	59
3.1.11. Levofloxacina	60
3.1.12. Marbofloxacina.....	60
3.1.13. Besifloxacina	61
3.1.14. Clinafloxacina.....	61
3.1.15. Garenoxacina.....	61
3.2. Mecanismo de ação.....	62
3.3. Farmacocinética e farmacodinâmica.....	63
3.4. Toxicidade, efeitos secundários e interações.....	66
3.5. Resistências.....	67
IV. OBJETIVOS.....	68
V. MATERIAIS E MÉTODOS	68
VI. RESULTADOS.....	71
1. Ácido Nalidíxico.....	71
2. Ciprofloxacina	72
3. Difloxacina.....	74
4. Enoxacina.....	75
5. Enrofloxacina.....	76
6. Fleroxacina.....	78
7. Lomefloxacina	79
8. Balofloxacina	80
9. Danofloxacina	82
10. Grepafloxacina.....	83
11. Levofloxacina	84
12. Marbofloxacina	86
13. Besifloxacina	87
14. Clinafloxacina	88
15. Garenoxacina	90
16. Alterações morfo-funcionais.....	92
VII. DISCUSSÃO	93
VIII. CONCLUSÃO	97
IX. BIBLIOGRAFIA.....	98
X. ANEXOS.....	106

1. Alinhamento múltiplo das sequências aminoacídicas de: <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> (estirpe KF147), <i>Streptococcus thermophilus</i> JIM 8232, <i>Haemophilus haemolyticus</i> M21621, <i>Yersinia pestis</i> , <i>Crithidia fasciculata</i> , <i>Leishmania infantum</i> , <i>Trypanosoma cruzi</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (estirpe ATCC 204508/S288c), <i>Mus musculus</i> , <i>Homo sapiens</i> , <i>Equus caballus</i> e <i>Canis familiaris</i>	106
2. Alinhamento múltiplo das sequências aminoacídicas de: <i>Leishmania braziliensis</i> , <i>L. mexicana</i> (estirpe MHOM/GT/2001/U1103), <i>L. major</i> , <i>L. chagasi</i> , <i>L. infantum</i> , <i>L. donovani</i> (estirpe BPK282A1)	112

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição geográfica de <i>L. infantum</i> (syn. <i>L. chagasi</i>).....	6
Figura 2: Mecanismo de ação geral das topoisomerases.....	16
Figura 3: Funções das topoisomerases inibidas pelas fluoroquinolonas.....	21
Figura 4: Árvore filogenética ilustrativa das distâncias evolutivas de alguns membros da família da topoisomerase II	22
Figura 5: Árvore filogenética ilustrativa das diferenças evolutivas das topoisomerases II de algumas espécies de <i>Leishmania</i> spp.....	23
Figura 6: Infecção de Leishmaniose canina em Portugal	26
Figura 7: Estrutura base das fluoroquinolonas	52
Figura 8: Estrutura molecular do ácido nalidíxico	56
Figura 9: Estrutura molecular da ciprofloxacina.....	56
Figura 10: Estrutura molecular da difloxacina.....	57
Figura 11: Estrutura molecular da enoxacina.....	57
Figura 12: Estrutura molecular da enrofloxacina.....	58
Figura 13: Estrutura molecular da fleroxacina.....	58
Figura 14: Estrutura molecular da lomefloxacina	59
Figura 15: Estrutura molecular da balofloxacina	59
Figura 16: Estrutura molecular da danofloxacina	59
Figura 17: Estrutura molecular da grepafloxacina	59
Figura 18: Estrutura molecular da levofloxacina	60
Figura 19: Estrutura molecular da marbofloxacina.....	60
Figura 20: Estrutura molecular da besifloxacina.....	61
Figura 21: Estrutura molecular da clinafloxacina	61
Figura 22: Estrutura molecular da garenoxacina.....	61
Figura 23: Vias de metabolização de algumas fluoroquinolonas.....	64
Figura 24: Estatística descritiva dos valores de absorvância (A), das contagens parasitárias (B) e sobreposição dos dois parâmetros (C) nos ensaios de três dias com ácido nalidíxico	71
Figura 25: Estatística descritiva dos valores de absorvância (A), das contagens parasitárias (B) e sobreposição dos dois parâmetros (C) nos ensaios de sete dias com ácido nalidíxico....	72
Figura 26: Estatística descritiva dos valores de absorvância (A), das contagens parasitárias (B) e sobreposição dos dois parâmetros (C) nos ensaios de três dias com ciprofloxacina.....	72
Figura 27: Estatística descritiva dos valores de absorvância (A), das contagens parasitárias (B) e sobreposição dos dois parâmetros (C) nos ensaios de sete dias com ciprofloxacina	73

Figura 28: Estatística descritiva dos valores de absorvância (A), das contagens parasitárias (B) e sobreposição dos dois parâmetros (C) nos ensaios de três dias com difloxacina	74
Figura 29: Estatística descritiva dos valores de absorvância (A), das contagens parasitárias (B) e sobreposição dos dois parâmetros (C) nos ensaios de sete dias com difloxacina.....	74
Figura 30: Estatística descritiva dos valores de absorvância (A), das contagens parasitárias (B) e sobreposição dos dois parâmetros (C) nos ensaios de três dias com enoxacina	75
Figura 31: Estatística descritiva dos valores de absorvância (A), das contagens parasitárias (B) e sobreposição dos dois parâmetros (C) nos ensaios de sete dias com enoxacina.....	76
Figura 32: Estatística descritiva dos valores de absorvância (A), das contagens parasitárias(B) e sobreposição dos dois parâmetros (C) nos ensaios de três dias com enrofloxacina.....	77
Figura 33: Estatística descritiva dos valores de absorvância (A), das contagens parasitárias (B) e sobreposição dos dois parâmetros (C) nos ensaios de sete dias com enrofloxacina.....	77
Figura 34: Estatística descritiva dos valores de absorvância (A), das contagens parasitárias (B) e sobreposição dos dois parâmetros (C) nos ensaios de três dias com fleroxacina	78
Figura 35: Estatística descritiva dos valores de absorvância (A), das contagens parasitárias (B) e sobreposição dos dois parâmetros (C) nos ensaios de sete dias com fleroxacina.....	78
Figura 36: Estatística descritiva dos valores de absorvância (A), das contagens parasitárias (B) e sobreposição dos dois parâmetros (C) nos ensaios de três dias com lomefloxacina	79
Figura 37: Estatística descritiva dos valores de absorvância (A), das contagens parasitárias (B) e sobreposição dos dois parâmetros (C) nos ensaios de sete dias com lomefloxacina.....	80
Figura 38: Estatística descritiva dos valores de absorvância (A), das contagens parasitárias (B) e sobreposição dos dois parâmetros (C) nos ensaios de três dias com balofloxacina	80
Figura 39: Estatística descritiva dos valores de absorvância (A), das contagens parasitárias (B) e sobreposição dos dois parâmetros (C) nos ensaios de sete dias com balofloxacina	81
Figura 40: Estatística descritiva dos valores de absorvância (A), das contagens parasitárias (B) e sobreposição dos dois parâmetros (C) nos ensaios de três dias com danofloxacina.....	82
Figura 41: Estatística descritiva dos valores de absorvância (A), das contagens parasitárias (B) e sobreposição dos dois parâmetros (C) nos ensaios de sete dias com danofloxacina	82
Figura 42: Estatística descritiva dos valores de absorvância (A), das contagens parasitárias (B) e sobreposição dos dois parâmetros (C) nos ensaios de três dias com grepafloxacina	83
Figura 43: Estatística descritiva dos valores de absorvância (A), das contagens parasitárias (B) e sobreposição dos dois parâmetros (C) nos ensaios de sete dias com grepafloxacina	84
Figura 44: Estatística descritiva dos valores de absorvância (A), das contagens parasitárias (B) e sobreposição dos dois parâmetros (C) nos ensaios de três dias com levofloxacina	85

Figura 45: Estatística descritiva dos valores de absorvância (A), das contagens parasitárias (B) e sobreposição dos dois parâmetros (C) nos ensaios de sete dias com levofloxacina	85
Figura 46: Estatística descritiva dos valores de absorvância (A), das contagens parasitárias (B) e sobreposição dos dois parâmetros (C) nos ensaios de três dias com marbofloxacin.....	86
Figura 47: Estatística descritiva dos valores de absorvância (A), das contagens parasitárias (B) e sobreposição dos dois parâmetros (C) nos ensaios de sete dias com marbofloxacin	86
Figura 48: Estatística descritiva dos valores de absorvância (A), das contagens parasitárias (B) e sobreposição dos dois parâmetros (C) nos ensaios de três dias com besifloxacina	87
Figura 49: Estatística descritiva dos valores de absorvância (A), das contagens parasitárias (B) e sobreposição dos dois parâmetros (C) nos ensaios de sete dias com besifloxacina.....	88
Figura 50: Estatística descritiva dos valores de absorvância (A), das contagens parasitárias (B) e sobreposição dos dois parâmetros (C) nos ensaios de três dias com clinafloxacin	88
Figura 51: Estatística descritiva dos valores de absorvância (A), das contagens parasitárias (B) e sobreposição dos dois parâmetros (C) nos ensaios de sete dias com clinafloxacin.....	89
Figura 52: Estatística descritiva dos valores de absorvância (A), das contagens parasitárias (B) e sobreposição dos dois parâmetros (C) nos ensaios de três dias com garenoxacin	90
Figura 53: Estatística descritiva dos valores de absorvância (A), das contagens parasitárias (B) e sobreposição dos dois parâmetros (C) nos ensaios de sete dias com garenoxacin.....	91
Figura 54: Aspetto de formas promastigota de <i>L. infantum</i> observadas ao microscópio ótico em cultura não tratada (A) — ampliação 200x — e em cultura exposta a balofloxacina (10 µM/mL) (B) — ampliação de 400x.....	92
Figura 55: Conformação de rosetas de multiplicação de <i>L. infantum</i> em cultura não tratada (A) e em cultura exposta a levofloxacina (10 µM/mL) (B) — ampliação de 400x	93
Figura 56: Alterações morfológicas observadas em culturas tratadas com fluoroquinolonas: flagelo duplo (A), aspeto atípico do corpo (B) e formato arredondado (C) — coloração de Giemsa, ampliação 1000x.....	93

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Estadiamento da Leishmaniose canina de acordo com a avaliação serológica, sinais clínicos, alterações laboratoriais, terapêutica e prognóstico.....	49
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa	— Aminoácidos
ADN	— Ácido desoxirribonucleico
AINEs	— Anti-inflamatórios não esteróides
ARN	— Ácido ribonucleico
ARNm	— Ácido ribonucleico mensageiro
ARNr	— Ácido ribonucleico ribossómico
ATP	— Adenosina trifosfato
C-	— Controlo negativo (cultura sem tratamento)
C+	— Controlo positivo (cultura tratada com antimoniato de meglumina)
CMB	— Concentração Mínima Bactericida
CMI	— Concentração Mínima Inibitória
CO ₂	— Dióxido de carbono
CR3	— Recetor de complemento 3
DC-SIGN	— <i>Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin</i>
DNA	— <i>Deoxyribonucleic acid</i>
DRC	— Doença Renal Crónica
E.U.A.	— Estados Unidos da América
ELISA	— <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EMA	— <i>European Medicines Agency</i>
GIPL	— Glicoinositolfosfolípido
GP63	— Metaloprotease glicoproteína 63
GPI	— Glicosilfosfatidilinositol
GSP	— Gel secretado por promastigotas
IFAT	— <i>Indirect Fluorescent Antibody Test</i>
IFN- γ	— Interferão-gama
IgA	— Imunoglobulina classe A
IgG	— Imunoglobulina classe G
IgG1	— Imunoglobulina G isotipo 1
IL	— Interleucina
iNOS	— Enzima sintetase induzida do óxido nítrico
IRIS	— <i>International Renal Interest Society</i>
kADN	— ADN cinetoplastidial
LiTOPII	— Topoisomerase II de <i>L. infantum</i>

LPG — Lipofosoglicano
 MHCII — Complexo *Major* de Histocompatibilidade Classe II
 MTS — 3-(4,5-dimetiltazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio salino
 OCH₃ — Grupo metoxilo
 OIE — *Office International des Épizooties* (Organização Mundial de Saúde Animal)
 ONLeish — Observatório Nacional das Leishmanioses
 PCR — *Polymerase Chain Reaction*
 QRDR — *Quinolone Resistance-Determining Region*
 RAPD — *Random Amplification of Polymorphic DNA*
 RFLP — *Restriction Fragment Length Polymorphism*
Slc11a1 — *Solute carrier family 11 member a1*
Syn. — *Synonymum*
 TGF-β — *Transforming Growth Factor beta*
 T_H1 — Resposta imune T-helper tipo 1
 T_H2 — Resposta imune T-helper tipo 2
 TNF-α — *Tumor Necrosis Factor alfa*
 UPC — Razão Proteína : Creatinina Urinária
 VIH — Vírus da imunodeficiência humana
 WHO — *World Health Organization* (Organização Mundial de Saúde)
 kDa — Quilodalton
 km — Quilómetro
 µg/mL — Micrograma por mililitro
 µL — Microlitro
 µM — Micromolar
 µm — Micrómetro
 M — Molar
 m — Metro
 mL — Mililitro
 mg/mL — Miligrama por mililitro
 mM — Milimolar
 nm — Nanómetro
 U/mL — Unidades por mililitro
 % — Percentagem
 °C — Grau Celsius

CAPÍTULO I. BREVE DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES DE ESTÁGIO

A decisão pela escolha de um estágio com atividade de investigação prendeu-se sobretudo, pelo meu gosto pela área de estudos da Parasitologia o que me permitiu, durante quatro meses (cerca de 800 horas), de trabalhar no Laboratório de Farmacologia e Toxicologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa.

Durante este período trabalhei com a câmara de fluxo laminar onde preparei as culturas de *Leishmania* e o respetivo meio de cultura, acompanhando diariamente o seu crescimento através das contagens dos parasitas em Câmara de Neubauer.

Seguidamente procedi à testagem de fluoroquinolonas, sendo os protozoários distribuídos por placas de cultura com 96 poços, onde testei as várias diluições dos antibióticos. Acompanhei diariamente ao microscópio ótico a evolução destas placas de cultura e reformulei os procedimentos sempre que foi necessário adequar o processo às observações efetuadas. Na tentativa de avaliar objetivamente a eficácia dos fármacos, utilizei um ensaio colorimétrico com MTS e procedi às leituras das placas num espectrofotómetro. Posteriormente, os dados foram tratados em Microsoft Excel[®].

No Laboratório de Parasitologia efetuei lâminas de *Leishmania*, dos poços tratados e não tratados, com coloração de Giemsa, com o objetivo de observar conformações anómalas e estabelecer relações com as concentrações de antibióticos.

Através desta vivência pude aperceber-me da importância da observação meticulosa e dos registos diários, para um investigador desta área obter fiabilidade nos seus resultados.

A realização deste estágio permitiu-me tomar consciência da necessidade da procura constante do aperfeiçoamento da técnica, através da persistência na tentativa, na deteção do erro, apesar de sentir, por vezes, momentos de desânimo que não obstaram a que continuasse a trabalhar até atingir os meus objetivos.

A pesquisa bibliográfica efetuada permitiu-me conhecer o nível atual do saber e refletir sobre hipóteses de trabalho que pudessem acrescentar algo, constituir alguma inovação, permitindo um avanço do conhecimento científico nesta área em estudo.

Este trabalho também constituiu uma mais valia na minha formação científica e pessoal, pois pude desenvolver novas competências e contactar com uma área de estudo com a qual me identifico.

Leishmania spp. é um parasita com ciclo de vida heteroxeno e que é transmitido pela fêmea de um inseto pertencente ao género *Phlebotomus* spp. presente na Europa, em África, no Médio Oriente e na Ásia, ou pelo género *Lutzomyia* spp. com distribuição na América do Sul (Santos-Gomes & Pereira da Fonseca, 2008). O parasita *Leishmania* pode assumir duas formas morfológicas distintas: uma forma promastigota, extracelular, que ocorre no intestino dos insetos vetores e, uma forma intracelular, amastigota, presente nas células do sistema mononuclear fagocítico do hospedeiro (Pearson & Sousa, 1996).

Para que ocorra a transmissão da doença é necessário que o inseto faça uma alimentação prévia num hospedeiro infetado devendo, em seguida, picar um segundo hospedeiro não-infetado (Pearson & Sousa, 1996). No Homem, algumas infeções são permanentemente assintomáticas, outras auto-limitantes (por exemplo, as lesões cutâneas causadas por *L. major*), enquanto outras levam ao desenvolvimento de sintomatologia cutânea, mucocutânea ou visceral, dependendo do tipo de tropismo que o parasita manifesta para os órgãos do hospedeiro (Pearson & Sousa, 1996). As principais espécies parasitárias existentes no Velho Mundo são: *L. infantum* com tropismo visceral e cutâneo, *L. donovani* com tropismo visceral, *L. major*, *L. tropica*, *L. killicki* e *L. aethiopica* com tropismo cutâneo [World Health Organization (WHO), 2010]. No Novo Mundo, as espécies identificadas no Homem são: *L. infantum* (syn. *L. chagasi*) com tropismo visceral e cutâneo, *L. braziliensis*, *L. mexicana*, *L. pifanoi*, *L. venezuelensis*, *L. garnhami*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis*, *L. shawi*, *L. naiff*, *L. lainsoni*, *L. lindenbergi*, *L. peruviana*, *L. colombiensis* com tropismo cutâneo, *L. braziliensis* e *L. panamensis* que mostram tropismo mucocutâneo (WHO, 2010). A forma cutânea de Leishmaniose mostra lesões na pele (nódulos cutâneos ou mucocutâneos) acompanhadas ou não de ulcerações podendo, no entanto, afetar outros órgãos (Mehlhorn, 2001). A Leishmaniose visceral zoonótica causada por *L. infantum* apesar de infetar várias espécies de mamíferos ocorre, mais comumente, no Cão e no Homem, sendo o primeiro considerado reservatório primário (Mehlhorn, 2001).

No Cão, a Leishmaniose é uma doença crónica, onde a cura parasitológica completa raramente ocorre apresentando, por isso, elevada incidência. Campino e Maia (2010) consideram-na uma doença re-emergente a nível mundial, em parte, devido às alterações climáticas e às características epidemiológicas dos vetores, estando a doença a assumir uma importância cada vez maior em Medicina Veterinária e em Saúde Pública, em especial, porque os clínicos nem sempre estão alertados para os quadros sintomáticos que surgem devido ao elevado número de hospedeiros infetados que se apresentam assintomáticos

(Gramiccia, 2011). A Leishmaniose antroponótica é endêmica em 88 países tropicais e subtropicais, existindo cerca de 350 milhões de pessoas em risco de infecção, sendo considerada uma das doenças mais negligenciadas e com maior impacto social, principalmente, ao nível dos países em vias de desenvolvimento (Gramiccia, 2011). Nas zonas endêmicas, a Leishmaniose visceral humana é sobretudo uma infecção oportunista em adultos co-infetados pelo vírus da imunodeficiência humana (VIH), apresentando a região Mediterrânica a maior taxa de prevalência de co-infecção (Freitas-Junior, Chatelain, Kim & Siqueira-Neto, 2012).

O desenvolvimento de técnicas de diagnóstico mais sensíveis e mais específicas tem mostrado uma elevada prevalência de infecção no Cão, apesar do número relativamente reduzido de casos clínicos. O leque díspar de manifestações clínicas e as diferentes medidas preventivas têm fomentado o desenvolvimento de estudos de investigação (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

No interior do hospedeiro, *Leishmania* após ser fagocitado pelos macrófagos, replica-se no sistema reticulo-endotelial, atingindo vários órgãos e desencadeando processos inflamatórios e lesões imunomediadas (Mehlhorn, 2001). As manifestações clínicas da Leishmaniose variam consoante a espécie de *Leishmania* infetante, a patogenicidade do parasita e a resposta imune do hospedeiro. As lesões podem estar confinadas à pele ou disseminadas por vários tecidos como nos casos de Leishmaniose visceral. Nos cães é uma doença sistémica que evolui progressivamente podendo apresentar, muitas vezes, manifestações cutâneas – assumindo um carácter viscerocutâneo (Bowman, 1999).

Dada a sua distribuição mundial, a importância em Saúde Pública e a ausência de terapêuticas que permitam um tratamento definitivo, a pesquisa de novas armas terapêuticas mais eficazes, menos tóxicas e de baixo custo é de extrema importância. Na última década, a descoberta de novos fármacos tem-se baseado na avaliação de moléculas que inibem proteínas homólogas e, simultaneamente, essenciais a outros sistemas biológicos. Um destes exemplos são as topoisomerasas de tipo II, enzimas ubiquitárias e essenciais à replicação e transcrição do ADN e à remodelação da cromatina. Esta família de enzimas codificada pela maioria dos protozoários pode constituir um excelente alvo terapêutico caso, o grau de homologia entre estas e as suas homólogas no hospedeiro, permita a ação inibitória específica dos fármacos sobre o parasita.

1. *Leishmania*

1.1. Breve referência histórica

No início do século XIX, o protozoário *Leishmania* foi identificado por Cunningham, Borovsky, Leishman, Donovan, Wright, Lindenberg e Vianna, sendo Ronald Ross que aparentemente lhe atribuiu o nome. Em 1904, Cathoire e Laveran identificaram este parasita em crianças e, em 1908, na Tunísia, Nicolle e Comte designaram a espécie de *L. infantum* e identificaram o Cão como o seu principal reservatório. As técnicas de diagnóstico baseadas na detecção de amastigotas em esfregaços por aposição de baço ou de lesões cutâneas usadas na época, continuam a ser os métodos de referência (Solano-Gallego *et al.*, 2009; WHO, 2010). Os compostos antimoniais trivalentes foram introduzidos em 1912, no Brasil, e o primeiro fármaco antimonial pentavalente começou a ser utilizado em 1922. Nos anos 70, no Quênia e, durante os anos 80, na Índia, foram registados os primeiros casos de resistência a estes fármacos em pacientes humanos com Leishmaniose visceral, o que levou à necessidade de existirem alternativas para o seu tratamento (WHO, 2010).

O primeiro caso de Leishmaniose descrito em Portugal foi em 1910, relatado por Dionísio Alvares, numa criança de nove anos de idade, residente em Lisboa. No ano seguinte, Alvares e Silva avaliaram a infeção em 300 cães da região de Lisboa, sendo que oito animais se apresentavam infetados por *Leishmania* (Campino & Maia, 2010).

1.2. Taxonomia

O protozoário *Leishmania* pertence à ordem Trypanosomatida, família Trypanosomatidae e ao género *Leishmania* que apresenta três subgéneros: *Viannia* (restrita ao Novo Mundo, causa as formas cutâneas mais desfigurantes), *Leishmania* e *Sauroleishmania*. Existem cerca de 300 espécies de *Leishmania* spp., 20 das quais têm carácter zoonótico e apesar de apresentarem morfologia semelhante, diferem nas características clínicas, biológicas e serológicas. Por vezes, estas características sobrepõem-se pelo que as diferenças entre as espécies nem sempre são claramente identificáveis (Roberts & Janovy, 2009; Seixas *et al.*, 2011). No entanto, se a espécie for a endémica esta poderá dar uma ideia de como a doença irá evoluir sendo, por isso, útil fazer-se a identificação do parasita visto permitir tirar algumas ilações quanto ao tratamento e às medidas de controlo que serão necessárias implementar. Os isolados não identificados devem ser comparados com as espécies de referência internacional que podem ser fornecidos pelos laboratórios de referências nacional ou internacional (WHO, 2010). A classificação taxonómica baseava-se, originalmente, na localização geográfica, manifestações

clínicas, vetores envolvidos na transmissão e características bioquímicas do parasita (Pearson & Sousa, 1996). Atualmente, a análise isoenzimática é a técnica de referência usada na identificação taxonômica, apesar de existirem outras técnicas moleculares disponíveis baseadas na amplificação de ADN por PCR (*polymerase chain reaction*), podendo esta análise ser efetuada a partir de amostras provenientes dos pacientes ou mesmo de flebótomos. As isoenzimas são produtos de diferentes formas alélicas de um gene e a variação enzimática num determinado locus reflete a existência de uma alteração na sequência que ocorreu durante o processo evolutivo. Por conseguinte, as classificações filogenéticas revelaram relações de evolução entre as diferentes espécies de *Leishmania*, que foram confirmadas pelo uso de marcadores moleculares (WHO, 2010). Os padrões isoenzimáticos mais utilizados são os das enzimas glicolíticas, do ciclo de Krebs e das transaminases. As seis espécies de maior importância para a saúde do Homem e que mostram diferentes distribuições geográficas e características epidemiológicas são: *L. tropica*, *L. major*, *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. donovani* e *L. infantum* (Roberts & Janovy, 2009). Contudo, nem sempre o diagnóstico e a identificação da espécie parasitária é fácil, em especial, se o imunodiagnóstico for baseado na deteção antigénica e se esta puder dar resultados falsos positivos na presença de outra espécie de *Leishmania* ou por antigenicidade cruzada com *Trypanosoma* spp., por exemplo. A literatura mais antiga é, muitas vezes, confusa porque os investigadores não discriminam as várias espécies de *Leishmania* ou consideram as diferentes espécies como uma única, amplamente distribuída com pequenas diferenças clínicas e propriedades imunológicas semelhantes. Esta indefinição foi sistematizada e simplificada com a caracterização bioquímica através da análise das isoenzimas (já referido), análises de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), análises RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*) e por sequenciação génica (Roberts & Janovy, 2009).

1.3. Biologia

Leishmania tem um ciclo de vida heteroxeno; parte decorre no tubo digestivo do inseto onde se diferencia na forma promastigota e o seu ciclo completa-se nos macrófagos do hospedeiro vertebrado sob a forma de amastigota, a forma parasitária intracelular. Os hospedeiros vertebrados de *Leishmania* são principalmente mamíferos, sendo o Homem, o Cão, o Gato e várias espécies de roedores frequentemente infetados. Na Bacia do Mediterrâneo, e em Portugal, a espécie mais importante é *L. infantum* (Seixas *et al.*, 2011), cuja distribuição é ilustrada pela figura 1.

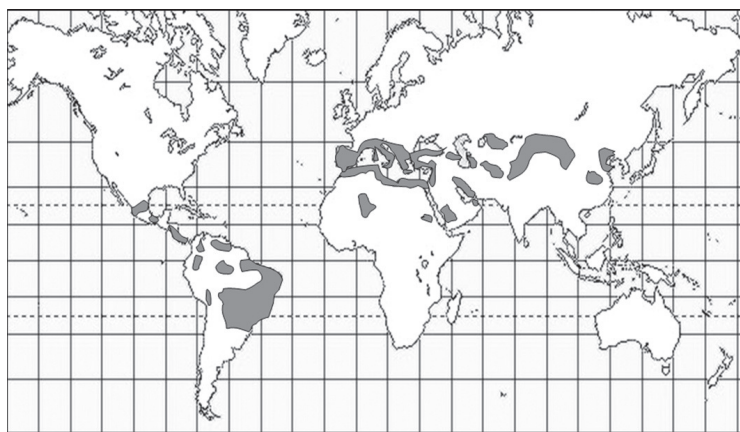


Figura 1: Distribuição geográfica de *L. infantum* (syn. *L. chagasi*) (Gramiccia, 2011).

Recentemente, cerca de uma dúzia de espécies de répteis foram identificadas como suscetíveis a *Leishmania* pertencentes ao subgênero *Sauroleishmania* (Urquhart, Armour, Duncan, Dunn & Jennings, 1996; Roberts & Janovy, 2009).

1.3.1. Ciclo de vida

Como já foi referido anteriormente, este protozoário apresenta um ciclo de vida que implica dois hospedeiros: um vetor invertebrado que transporta a forma promastigota e um hospedeiro vertebrado onde se desenvolve a forma amastigota (Solano-Gallego et al., 2009).

No aparelho digestivo dos vetores invertebrados é possível encontrarem-se as formas promastigotas infetantes de forma alongada (cerca de $15 \times 3 \mu\text{m}$) com flagelo, um cinetossoma e um cinetoplasto (estrutura mitocondrial especializada em forma de bastonete) localizados no pólo rostral do núcleo. Nos hospedeiros vertebrados é possível encontrar as formas amastigotas nos macrófagos, nas células de Langerhans e nos neutrófilos (Pearson & Sousa, 1996; Romão, Dias, Cruz, Marques & Monteiro, 2007; Santos-Gomes & Pereira da Fonseca, 2008; Roberts & Janovy, 2009). Os amastigotas apresentam uma forma ovóide ou arredondada e são, possivelmente, as células eucariotas mais pequenas (comprimento entre 2 e $6,8 \mu\text{m}$), exibindo um núcleo relativamente grande e excêntrico e um flagelo muito curto que se projeta ligeiramente além da bolsa flagelar, terminando junto à membrana celular (Pearson & Sousa, 1996; Santos-Gomes & Pereira da Fonseca, 2008; Roberts & Janovy, 2009).

A fêmea do inseto, ao alimentar-se de um hospedeiro vertebrado infetado por *Leishmania*, ingere células com formas amastigotas no seu interior. No intestino do vetor e durante o processo de digestão, as células fagocíticas rompem-se libertando os amastigotas que se transformam em promastigotas, que se dividem repetidamente por fissão binária e que depois migram em direção ao probóscide do inseto (Urquhart et al., 1996; Romão et al., 2007). De

salientar que o parasita apresenta dois ciclos independentes de multiplicação no vetor: inicialmente sob a forma de promastigotas procíclicos que mostram divisão contínua e, posteriormente, como promastigotas nectomonas indivisíveis que migram para uma região mais anterior do intestino médio, ocorrendo de seguida uma segunda fase de multiplicação – os promastigotas leptomonas (Gossage, Rogers & Bates, 2003). A forma final infetante é não-replicativa e designa-se de promastigota metacíclico. Quando o flebótomo parasitado se alimenta, inocula promastigotas que são regurgitados com saliva através do probóscide, no local de picada no hospedeiro vertebrado (Romão *et al.*, 2007; Solano-Gallego *et al.*, 2009). É neste momento que ocorre a fagocitose dos promastigotas pelos macrófagos e pelas células do sistema reticulo-endotelial. Estas células após fagocitarem o parasita, isolam-no num vacúolo fagocítico que se funde com lisossomas dando origem aos fagolisossomas, formando os vacúolos parasitóforos. Apesar das células fagocitárias procurarem eliminar o parasita através da cascata de radicais livres (óxido nítrico, superóxido) e hidrolases, o protozoário tem a capacidade de se evadir a estes mecanismos de defesa não específicos, conseguindo sobreviver e multiplicar-se no interior do fagolisossoma (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Nesta fase, os parasitas diferenciam-se em amastigotas e replicam-se por divisão binária no fagolisossoma (ambiente ácido), contudo a um ritmo muito mais lento do que no inseto vetor ou *in vitro*. Após vários ciclos replicativos, a célula infetada acaba por sofrer lise, libertando amastigotas que infetam novas células e atingem diferentes órgãos como os linfonodos, o baço, o fígado e a pele. Uma vez que a infeção inicial nem sempre é acompanhada de sintomatologia clínica, o parasitismo intracelular poderá persistir de forma crónica (localizada ou difusa) em tecidos mucocutâneos ou em órgãos viscerais, sendo a progressão da infeção dependente da eficiência da resposta imunitária do hospedeiro (Romão *et al.*, 2007; Seixas *et al.*, 2011).

Em resumo, pode-se afirmar que o protozoário *Leishmania* habita dois ambientes muito distintos: o tubo digestivo do inseto vetor e as células do sistema reticulo-endotelial do hospedeiro vertebrado. Talvez por este facto, o parasita sofre profundas alterações ultraestruturais, metabólicas e antigénicas moduladas por: modificações transcricionais, *turnover* e/ou alterações pós-transducionais das proteínas parasitárias. Por exemplo, a transformação da forma promastigota (extracelular) para a forma amastigota (intracelular) é acompanhada de uma perda do flagelo externo, da reorganização dos microtúbulos subpeliculares, de uma redução no consumo de oxigénio e da ativação de vias metabólicas específicas envolvidas na utilização de precursores dos ácidos nucleicos (Roberts & Janovy, 2009).

1.3.2. Hospedeiros Reservatórios

Segundo Roberts e Janovy (2009), o hospedeiro reservatório é um animal portador de uma infecção transmissível aos humanos, mesmo que pertença a uma espécie frequentemente infetada. No caso da Leishmaniose há sempre uma espécie reservatório, apesar de outros mamíferos poderem infetar-se (hospedeiros minoritários – *minor* – ou acidentais). Os hospedeiros *minor* contribuem, de forma mais reduzida, para a manutenção da doença e, raramente, facilitam a transmissão da doença à população humana; assim, os hospedeiros acidentais são mamíferos que embora infetados não têm um papel de destaque no ciclo do protozoário *Leishmania* (WHO, 2010). Para que uma espécie animal seja considerada reservatório é necessário demonstrar que o parasita depende dela para a sua manutenção a longo prazo, o que exige extensos estudos epidemiológicos e o cumprimento de vários critérios como são exemplo: ser uma espécie abundante constituindo uma boa fonte de alimento para os insetos vetores, existir um contacto estreito e frequente entre o hospedeiro e o vetor e o curso da infecção no hospedeiro ser prolongado. Atualmente, por exemplo, há cada vez mais evidências que sugerem que o gato doméstico é importante na manutenção do ciclo de vida de *L. infantum* e que o cão tem um papel relevante na transmissão da Leishmaniose cutânea na América do Sul.

Por outro lado, há muito que o Cão é apontado como o hospedeiro reservatório por excelência de *L. infantum*, graças à sua proximidade com os humanos. Há, no entanto, estudos que identificaram regiões com uma forte incidência de cães infetados sem que ocorram casos de infecção humana. No continente Americano foram identificados cães, cavalos, símios e asininos infetados com *L. braziliensis*, bem como canídeos infetados com *L. panamensis* e *L. peruviana* (WHO, 2010). Segundo a WHO (2010), *L. infantum* já foi identificada em várias espécies “exóticas” como por exemplo: raposas, chacais, lobos, guaxinins, felídeos, roedores, gambás, equídeos e primatas.

Leishmaniose Felina: O primeiro caso de Leishmaniose felina foi descrito na Argélia em 1912 (Pinto, 2012) e, desde os anos 80, Gramiccia (2011) descreveu 24 casos de Leishmaniose felina causada por *L. infantum*, a maioria pertencente ao zimodemo MON-1. É muito provável que os gatos constituam um reservatório secundário (Gramiccia, 2011), sendo a seroprevalência da infecção nesta espécie, no sul da Europa, variável entre os 0,9% e os 60,0% (Gramiccia, 2011). Em dois estudos epidemiológicos efetuados na região de Lisboa e de Setúbal a prevalência de infecção foi de 30,4% em gatos errantes e de 20,3% em gatos com proprietário, determinadas através da pesquisa de ADN parasitário pelo Observatório Nacional das Leishmanioses (ONLeish). Ao contrário do que acontece nos cães infetados com *Leishmania*, não se detetam anticorpos específicos anti-leishmania nos gatos, tendo apenas

sido encontrados em 1,32% da população analisada. Os gatos parecem ser mais resistentes à doença e, por isso, na maior parte dos casos, não apresentam sinais clínicos evidentes (Pinto, 2012). Quando adoecem desenvolvem lesões cutâneas nodulares, ulcerativas, com crosta ou papulares e de localização nasal, labial, nos ouvidos e nas pálpebras; é possível encontrar uma dermatite e alopecia generalizadas. A doença sistêmica com envolvimento do fígado, baço, linfonodos e rins é muito menos frequente do que no Cão. Apesar de não estar estabelecido um protocolo terapêutico para o tratamento da Leishmaniose felina, alguns animais tratados com os mesmos fármacos utilizados nos canídeos têm mostrado remissão sintomatológica e reconversão dos parâmetros bioquímicos (Pinto, 2012).

Leishmaniose Equina: Desde o início dos anos 80, foram descritas formas clínicas da doença em equinos domésticos de várias regiões da América Latina (Brasil, Venezuela, Argentina e Porto Rico). Lesões cutâneas nodulares ou ulceradas, com disseminação ocasional e sem visceralização são frequentes; a regressão espontânea tem sido relatada mesmo na ausência de tratamento (Gramiccia, 2011). Nos últimos anos foram diagnosticados na Europa cinco casos de Leishmaniose equina causados por *L. infantum* (Gramiccia, 2011). É de salientar, no entanto, que esta espécie aparentemente não constitui um reservatório pois, segundo um estudo experimental, quatro asininos foram infetados com *L. infantum* e, após uma fase inicial de replicação do parasita, as lesões desapareceram e a avaliação parasitológica e serológica foi negativa ao fim de 12 meses (Gramiccia, 2011).

1.3.3. Vetor

Os hospedeiros intermediários de *Leishmania* são pequenos insetos hematófagos da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, que se dividem em cinco géneros: *Phlebotomus* e *Sergentomyia* no Velho Mundo – Europa, África e Ásia – e *Lutzomyia*, *Brumptomyia* e *Warileya* no Novo Mundo. As fêmeas do género *Phlebotomus* no Velho Mundo e do género *Lutzomyia* no Novo Mundo, são os principais vetores de *Leishmania*, porque as fêmeas se alimentam de sangue por telmofagia (Roberts & Janovy, 2009; Solano-Gallego *et al.*, 2009). Existem centenas de espécies de flebotomos (aproximadamente 800 espécies); contudo, só uma minoria transmite a doença, cerca de 93 espécies (WHO, 2010). Algumas destas estão exclusivamente adaptadas a uma única subespécie de *Leishmania*, enquanto outras são mais permissivas, podendo transmitir várias subespécies de *Leishmania* (Baneth, Koutinas, Solano-Gallego, Bourdeau & Ferrer, 2008).

A maioria das espécies de flebotomíneos são exofílicas (permanecem no exterior durante a maturação dos ovos) e alimentam-se no exterior (exofágicas), apesar de também existirem espécies endofílicas (WHO, 2010). Na bacia Mediterrânica, as principais espécies de flebotomo são cinco: *P. perniciosus*, *P. ariasi*, *P. perfiliewi*, *P. neglectus* e *P. tobbi* e todas

exibem atividade crepuscular e noturna, apresentando uma maior atividade entre o final da primavera e o fim do outono. A temperatura ótima varia entre os 15 e os 28 °C, estando sempre associada uma humidade relativa alta e à ausência de vento ou de chuva (Solano-Gallego *et al.*, 2009; Seixas *et al.*, 2011). Por outro lado, *Lutzomyia longipalpis* é o principal vetor no Novo Mundo, estando as formas adultas ativas durante todo o ano (Gramiccia, 2011). Em Portugal e na Europa Ocidental as espécies mais relevantes são *P. perniciosus* e *P. ariasi*. Todavia, na zona do Algarve foram identificadas outras espécies como *P. sergenti* e *P. papatasi*, vetores de *L. tropica* e *L. major*, respetivamente (Seixas *et al.*, 2011). A capacidade de uma dada espécie de flebótomo funcionar como vetor depende da resistência do parasita às suas enzimas digestivas; de apresentar na superfície interna do intestino locais para a ligação dos lipofosfoglicanos dos promastigotas de forma a possibilitar a fixação destes; e das condições para a diferenciação em promastigotas metacíclicos, a única forma infetante (WHO, 2010).

Devido ao seu exosqueleto flexível e delicado, a sobrevivência dos flebótomos depende da capacidade destes se manterem afastados de locais quentes e secos. Normalmente voam pequenas distâncias (entre os 200 m e os 2,5 km), podendo entrar em habitações à noite, devido ao fototropismo positivo. Para se reproduzirem necessitam de uma combinação de escuridão, humidade elevada e detritos orgânicos de forma a que as larvas se possam alimentar. Estes requisitos estão muitas vezes disponíveis nas tocas de animais, árvores ocas e fendas, debaixo de troncos e entre folhas (Roberts & Janovy, 2009).

Nos últimos anos, têm sido desenvolvidas várias teorias que tentam explicar a relação entre as mudanças climáticas e a epidemiologia de doenças infecciosas como a Leishmaniose, como por exemplo: o aumento das taxas de proliferação do vetor por causa do aumento das temperaturas, as épocas de transmissão mais prolongadas ou as mudanças no equilíbrio ecológico devidas à migração dos vetores, dos hospedeiros reservatórios e das populações humanas. De facto, a temperatura ambiente influencia a alimentação dos insetos vetores e a maturação do protozoário no vetor mas, na Europa, a probabilidade da picada pelo inseto vetor sofre ainda de uma grande sazonalidade e na maioria das zonas é restrita aos meses que apresentam temperaturas mais elevadas (Semenza & Menne, 2009).

Adicionalmente, estudos recentes demonstram que as secreções salivares são determinantes no potencial patogénico do vetor (Bates, 2007; Roberts & Janovy, 2009). A saliva poderá apresentar moléculas vasodilatadoras que inibem a agregação plaquetária, evitando a coagulação sanguínea e aumentando o fluxo sanguíneo de forma a facilitar a alimentação do inseto. Já foram identificadas na saliva do vetor proteínas com ação vasodilatadora (*maxadilan*) que facilitam o estabelecimento da infeção por *Leishmania*, por terem uma ação

imunossupressora no hospedeiro vertebrado e por modularem a produção de citocinas pelas células apresentadoras de antígenos. Para justificar a sua ação imunomoduladora, têm sido propostas várias hipóteses: a redução da capacidade de produção de óxido nítrico e/ou de peróxido de hidrogénio pelos macrófagos do hospedeiro, a redução da apresentação antigénica, a indução de sobreexpressão de IL-4 por linfócitos, a inibição dos linfócitos T *helper* do tipo 1 ou a redução da expressão de moléculas co-estimulantes (B7-1/B7-2 ou CD40) pelas células apresentadoras de antígenos. Recentemente, algumas proteínas salivares têm sido testadas como vacinas, em ratos, tendo resultado numa proteção total ou na redução da gravidade da infeção (Romão *et al.*, 2007; Roberts & Janovy, 2009).

A identificação da espécie do inseto vetor é crítica se o seu controlo for parte integrante de uma estratégia concertada, pelo que é contraproducente focar o combate a determinados vetores que não estejam infetadas com o parasita ou cujas formas, apesar de morfologicamente idênticas, não sejam infetantes (Romão *et al.*, 2007; Roberts & Janovy, 2009).

Quando os flebótomos se alimentam de um animal infetado, ingerem os amastigotas que se encontram nos fagolisossomas dos macrófagos e de outros fagócitos. A diminuição da temperatura e o aumento do pH no interior do inseto despoleta o desenvolvimento do parasita. Quando chegam à parte posterior do intestino médio, os parasitas transformam-se em promastigotas procíclicos (forma pouco móvel confinada pela matriz peritrófica – uma malha de quitina segregada pelo epitélio intestinal) e multiplicam-se por fissão binária. Após alguns dias, a taxa de replicação diminui e diferenciam-se em promastigotas nectomonas bastante alongados e móveis. Estas formas migratórias acumulam-se na extremidade anterior da matriz peritrófica e libertam-se graças à ação de uma quitinase secretada pelo parasita que permite a sua deslocação em direção à parte anterior do intestino médio, onde se ligam às microvilosidades do epitélio intestinal até alcançarem a válvula estemodeal que testemunha a junção entre o intestino anterior e o médio. Uma vez atingida a válvula estemodeal, os promastigotas nectomonas transformam-se em promastigotas leptomonas, formas mais curtas que também se dividem e que secretam um gel (gel secretado por promastigotas – GSP) fundamental na transmissão da doença. Alguns destes promastigotas nectomonas e leptomonas também se fixam à superfície da válvula e diferenciam-se em promastigotas haptomonas; esta forma de adesão é mecanicamente diferente da observada no epitélio do intestino médio, sendo mediada pela ligação da extremidade do flagelo a estruturas semelhantes a hemidesmosomas. Ao fim de cinco a sete dias, alguns promastigotas leptomonas acabam por se diferenciar em promastigotas metacíclicos que serão inoculados no hospedeiro vertebrado nas refeições seguintes (Bates, 2007; Roberts & Janovy, 2009).

Tanto os animais sintomáticos como os assintomáticos infetados podem infetar o inseto, apesar dos sintomáticos terem maior sucesso. Esta observação estará, provavelmente, relacionada com a imunossupressão do hospedeiro que se manifesta pelos baixos níveis de linfócitos T CD4⁺ circulantes (Baneth *et al.*, 2008). Saliente-se que a sobrevivência do parasita durante o inverno é feita principalmente pelos cães infetados, pois não está descrita a transmissão transovárica de *Leishmania* em flebótomos (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Apesar dos flebótomos se mostrarem biologicamente adaptados à transmissão de *Leishmania*, foram propostos outros potenciais vetores hematófagos como as carraças e as pulgas, sem que a transmissão por estes se tenha verificado naturalmente.

Há muito que o mecanismo de transmissão entre o vetor e o hospedeiro é debatido, existindo duas linhas de pensamento: Short, no início do século XX, defendia a teoria da regurgitação, propondo que os promastigotas formavam uma obstrução no intestino que tinha que ser resolvida por regurgitação – *blocked fly hypothesis*; outros investigadores defendem a teoria da inoculação, ou seja, apenas os promastigotas presentes no probóscide são transmitidos no momento da picada. Mais recentemente, Schlein e seus colegas (1992) observaram que os insetos infetados apresentam frequentemente lesões na válvula estemodeal e propuseram a hipótese de estas se deverem à quitinase, favorecendo o refluxo de parasitas a partir do intestino médio por ação das bombas faríngea e cibarial durante a ingestão de sangue. No entanto, ainda não é claro se este mecanismo é essencial à transmissão da doença ou se esta lesão apenas facilita a transmissão do parasita em determinadas circunstâncias (Bates, 2007).

Também foi observada, apenas em insetos infetados, a presença de uma substância com uma consistência semelhante a um gel (GSP), que é produzida pelos próprios promastigotas e que promove a obstrução do intestino médio. O seu principal componente é uma glicoproteína de elevado peso molecular denominada proteofosfoglicano filamentoso, que obstrui e distende o intestino anterior e médio. Apesar do proteofosfoglicano filamentoso ser o principal componente do GSP (e de ser crítico na transmissão da doença), está também descrita a presença de células promastigotas, na sua maioria, leptomonas. Existem, ainda, os promastigotas haptomonas fixos à camada cuticular da válvula estemodeal e ao estômago já referidos anteriormente. O papel dos promastigotas haptomonas no ciclo do parasita pode também passar pela produção de GSP, designando-se formas “altruístas”, uma vez que não infetam o hospedeiro mas contribuem para que os promastigotas metacíclicos sejam transmitidos (Bates, 2007).

A presença de protozoários nas glândulas salivares dos vetores tem sido descrita em alguns estudos e considera-se relevante para a transmissão. No entanto, não é clara a via pela qual os parasitas atingem esta localização existindo duas hipóteses: deslocam-se caudalmente no

probóscide e de forma contracorrente no ducto salivar (como ocorre no caso do tripanossoma) ou, através da parede do intestino médio e do hemocélio, penetram a parede glandular (análogo aos esporócitos no plasmódio). Uma vez que é difícil dissecar a glândula salivar sem a contaminar inadvertidamente com parasitas presentes no intestino, não foi ainda possível esclarecer com segurança qual a via migratória (Bates, 2007).

Por fim, tem sido observado que a alimentação de flebotomíneos infetados por microcapilares pode levar ao surgimento de parasitas na micção emitida pelo ânus do vetor. É curioso que tanto *Phlebotomus* como *Lutzomyia* não contaminados sofram um processo de pré-diurese quando estão a alimentar-se do sangue. A pré-diurese resulta na concentração do componente celular do sangue durante a refeição, sendo o excesso de plasma eliminado em gotas através do ânus. Em caso de estarem parasitados é possível que os vetores excretem parasitas por esta via enquanto se estão a alimentar do hospedeiro mamífero (Bates, 2007).

1.3.4. Outros modos de transmissão

Leishmania pode ser eventualmente transmitida por outras vias que não passem pelo flebótomo, como são exemplo: a transfusão sanguínea a partir de dadores infetados, a transmissão vertical e a transmissão venérea (Solano-Gallego *et al.*, 2011). Também se suspeita que possa haver transmissão através de feridas ou de mordeduras (o que poderá explicar a presença de Leishmaniose em zonas não endémicas e na ausência do vetor) e a transmissão por outros artrópodes hematófagos como as pulgas ou as carraças (Solano-Gallego *et al.*, 2009; Solano-Gallego *et al.*, 2011).

A transmissão congénita de espécies viscerais de *Leishmania* foi observada em humanos e, experimentalmente, em ratos. Em cães de raça Beagle, a transmissão vertical foi demonstrada experimentalmente presumindo-se que a transmissão tenha sido transplacentária. No entanto, por existirem resultados contraditórios em cães naturalmente infetados, esta via de transmissão é considerada rara (Baneth *et al.*, 2008).

1.4. Replicação do ADN cinetoplastidial – a importância das topoisomerases

O protozoário *Leishmania* está entre os organismos eucariotas mais primitivos que divergiu muito ancestralmente no processo evolutivo, pertencendo à ordem Kinetoplastida que mostra com particularidade a existência de uma estrutura especializada, o cinetoplasto. Este organelo representa uma forma rara e primitiva de organização do ADN (ADN cinetoplastidial, kADN), que se organiza numa complexa rede constituída por dois tipos de moléculas que se entrelaçam; 90% do kADN são minicírculos (vários milhares de cópias por célula) e 10% são maxicírculos (25 a 50 cópias por célula). Os minicírculos codificam para ARNs que modulam a transcrição do ARN, enquanto os maxicírculos codificam ARN ribossomais e para proteínas relacionadas com a atividade mitocondrial sendo, por isso, essenciais à formação de ATP. Uma das principais características dos maxicírculos é que os seus transcritos apresentam uma uridina na extremidade 5' e várias *open reading frames* funcionais, processo conhecido por edição (Hanke, Ramiro, Trigueros, Roca & Larraga, 2003; Das *et al.*, 2006a).

O mecanismo de replicação do ADN cinetoplastidial constitui outra peculiaridade destes organismos. Enquanto que nos eucariotas superiores, o ADN mitocondrial replica-se ao longo do ciclo celular, no caso dos cinetoplastídeos a sua replicação é sincronizada com a do ADN nuclear ocorrendo, portanto, apenas uma vez durante o ciclo celular. Durante a replicação, os minicírculos são libertados da rede e as cadeias-filhas integradas na periferia da mesma, promovendo a remodelação da estrutura tridimensional do cinetoplasto. Apesar dos minicírculos apenas se replicarem quando perdem a ligação à rede, os maxicírculos não se separam desta durante a sua replicação. Contudo, para que a replicação destas estruturas decorra é essencial a intervenção das topoisomerases de tipo II, devido aos problemas de natureza topológica que estão presentes (nós, laços e catenanos). Assim, estas enzimas são fundamentais na replicação do ADN, na transcrição, na segregação cromossómica e na estabilização cromossómica (Torri, Carpenter & Englund, 1996; Hanke *et al.*, 2003; Das *et al.*, 2006a).

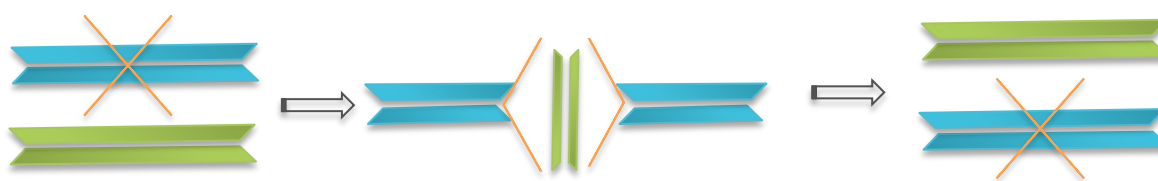
1.4.1. Classificação das Topoisomerases

As topoisomerases são enzimas ubiquitárias que resolvem complexidades topológicas geradas durante o metabolismo do ADN. Estas enzimas dividem-se em duas famílias de acordo com o tipo de corte no ADN, a especificidade pelo substrato, os cofatores enzimáticos e a composição das subunidades nas diferentes famílias de topoisomerases (Das, Dasgupta, Sengupta & Majumder, 2004; Das, Ganguly & Majumder, 2008). As de **tipo I** funcionam como proteínas monoméricas que catalisam quebras transitórias simples que alteram a estrutura do ADN, ao promoverem a passagem da cadeia clivada pela outra cadeia intacta, reduzindo o stress torsional gerado pelo superenrolamento negativo ou positivo e permitindo

que a replicação e a transcrição ocorram. De acordo com o seu mecanismo de ação e com a sequência aminoacídica, as topoisomerases de tipo I podem ser subdivididas no tipo IA quando se ligam covalentemente ao fosfato 5' (topoisomerases I e III de *Escherichia coli* e de arqueobactérias, topoisomerases III dos eucariotas, girase reversa e topoisomerase III de *Saccharomyces cerevisiae*) e no tipo IB quando se ligam covalentemente ao fosfato 3' (topoisomerases I dos eucariotas, do vírus vaccinia e topoisomerases V das arqueobactérias) (Cheesman, 2000; Das *et al.*, 2008). As topoisomerases de tipo IA promovem relaxamento no sentido negativo e necessitam de magnésio como cofator. As topoisomerases IB são capazes de relaxar a cadeia de ADN tanto em sentido negativo como positivo com igual eficácia e sem necessitarem de iões metálicos (Das *et al.*, 2004; Das *et al.*, 2008).

As topoisomerases de **tipo II** funcionam como homodímeros nos eucariotas e como tetrameros nas bactérias. Ao clivarem as duas cadeias da dupla hélice (com gasto de ATP), promovem a passagem de uma cadeia dupla intacta através do duplo corte gerado (figura 2). Estas enzimas podem provocar relaxamento e resolver catenanos e/ou nós na molécula de ADN. A família enzimática inclui a ADN girase, a topoisomerase IV de *E. coli*, todas as topoisomerases II de mamíferos (com duas isoformas, α e β) e as topoisomerases VI das arqueobactérias. Pensa-se que as reações catalisadas pela topoisomerase II envolvem a ligação desta a dois segmentos do ADN: um segmento G (*gate*) que é clivado nas duas cadeias pela enzima através de uma ligação éster entre as tirosinas ativas e os fosfatos 5' e, um segmento T (transporte) que passa pelo local de corte no segmento G estabilizado pela enzima (Das *et al.*, 2004; 2008).

A reação catalítica das topoisomerases divide-se em três etapas: 1) ligação da enzima ao substrato de ADN; 2) quebra da cadeia por uma reação de transesterificação acompanhada pela formação de uma ligação fosfodiéster transitória entre o resíduo de tirosina do centro ativo e as terminações no local de corte do ADN; 3) religação das terminações clivadas e libertação da enzima. Em condições fisiológicas, os complexos enzima-ADN são intermediários fugazes que estão presentes em baixas concentrações, toleráveis pela célula. Se o número de quebras de cadeia for elevado ou muito reduzido, podem suceder efeitos deletérios como mutações, inserções, deleções e aberrações cromossómicas. Portanto, as topoisomerases possuem uma dualidade inerente ao catalizarem reações fundamentais para a célula mas, simultaneamente, têm a capacidade de infligir danos irreversíveis e críticos no genoma do organismo (Das *et al.*, 2008).



Legenda:

- ADN cadeia 1
- ADN cadeia 2
- Topoisomerase

Figura 2: Mecanismo de ação geral das topoisomerases (adaptado de Drilca & Zhao, 1997).

1.4.2. Estrutura das Topoisomerases

As **topoisomerases tipo I** de cinetoplastídeos foram inicialmente isoladas em *L. donovani*, *Trypanosoma cruzi* e *Crithidia fasciculata*. Estas enzimas nativas purificadas (65-79 kDa) têm atividade catalítica independente de ATP. A primeira sequência nucleotídica descrita foi a de *L. donovani* por Broccoli, Marquis, Papadopoulos, Olivier e Drolet (1999) e veio a mostrar uma extensa homologia com o domínio central das topoisomerases tipo IB de outros eucariotas incluindo vários motivos conservados no domínio C-terminal (Das *et al.*, 2004; 2008).

Nos eucariotas as topoisomerases de tipo IB são monoméricas e apresentam quatro domínios atendendo às suas diferentes propriedades físicas, à sua sensibilidade proteolítica, à sequência aminoacídica e a análise complementar de fragmentos (Das *et al.*, 2004; 2008). O domínio N-terminal é relativamente divergente entre espécies, contém sequências de localização nuclear e é altamente sensível à proteólise, sendo dispensável para a atividade enzimática *in vitro*; o domínio central é o maior, está implicado na catálise e na ligação do ADN e mostra elevada conservação filogenética, principalmente, na região de interação com o substrato; o domínio *linker* é pouco conservado, tem um comprimento variável e está envolvido na ligação ao ADN; por fim, o domínio C-terminal que é o mais conservado, contém tirosina no centro catalítico (Hanke *et al.*, 2003; Das *et al.*, 2004; 2008). A clivagem do ADN ocorre após uma reação de transesterificação que inclui um ataque nucleofílico por esta tirosina (Tyr⁷²³ na Topo I humana) a uma ligação fosfodiéster do substrato e a consequente formação de uma ligação covalente com o grupo fosfotirosil 3' do ADN. Na fase de religação ocorre uma segunda reação de transesterificação que implica o ataque à extremidade 5'-hidroxil livre que

liberta a enzima da molécula de ADN. Enquanto as topoisomerases I bacterianas, virais e humanas são codificadas por um gene que contém dois domínios muito conservados (ligação ao ADN e centro ativo), nos cinetoplastídeos a topoisomerase I é codificada por dois genes que dão origem a uma topoisomerase I heterodimérica. O surgimento da segunda subunidade na família dos cinetoplastídeos provocou um revés na investigação da evolução e conservação funcional da família do tipo IB (Das *et al.*, 2008).

Os genes da **topoisomerase tipo II** de cinetoplastídeos foram isolados e sequenciados em *L. donovani*, *L. infantum*, *L. chagasi*, *T. cruzi*, *T. brucei* e *C. fasciculata*, tendo-se verificado que estes genes e respetivas proteínas eram menores que as suas homólogas nos mamíferos (Das *et al.*, 2004). Até à data não foi detetada atividade girase em nenhuma delas (capacidade de introduzir superenrolamentos na molécula de ADN), sendo a sua atividade enzimática e sequência génica mais próximas das proteínas homólogas dos eucariotas do que das topoisomerases tipo II dos procariotas (Burri, Bodley & Shapiro, 1996); foi calculada 30 a 35% de identidade e 45 a 65% de similaridade da topoisomerase II de *Leishmania* spp. com a topoisomerase II humana (Das *et al.*, 2004). As topoisomerases II dos eucariotas apresentam três domínios com base na sua homologia com a ADN girase bacteriana: o domínio N-terminal apresenta-se muito conservado entre espécies e possui atividade ATPásica; o domínio *core* ou central, que contém o centro catalítico, e o domínio C-terminal que mostram menor grau de conservação. Pensa-se que seja neste último, onde se localizam os vários elementos reguladores como os sinais de localização nuclear, os locais de fosforilação e as sequências que promovem a dimerização e facilitam as interações com outras proteínas (Cheesman, 2000; Hanke *et al.*, 2003).

Nos cinetoplastídeos, a topoisomerase II pode dividir-se num domínio N-terminal ATPásico, num domínio central que interage com a molécula de ADN e num domínio C-terminal menos conservado que possui uma extensão de 60 aminoácidos, bastante divergente do que existe nos mamíferos. Este domínio assume especial importância pelo facto de poder ser aproveitado para o desenvolvimento de antiparasitários específicos. Adicionalmente, e comparativamente à enzima humana, a proteína parasitária tem maior afinidade para o substrato, pois efetua maior número de cortes por molécula de ADN, proporcionando maior oportunidade de atuação aos fármacos anti-topoisomerase II (Das *et al.*, 2006; 2008).

Apesar das topoisomerases IIA serem mecanisticamente semelhantes, estas enzimas nos eucariotas são homodímeros e os seus homólogos bacterianos (a girase e a topoisomerase IV) tetrâmeros. A topoisomerase IV é composta por duas subunidades (*par C* e *par E*); enquanto a ADN girase tem uma constituição A₂B₂, formada pelas subunidades *gyr A* com um centro

ativo, enquanto as *gyr B* mostram uma atividade ATPásica correspondendo aos domínios C- e N-terminal dos eucariotas (Didier *et al.*, 2005; Das *et al.*, 2008).

A comparação das sequências aminoacídicas evidenciam diferenças específicas entre as topoisomerases humanas e as dos protozoários. Os genes de *T. brucei* e de *T. cruzi* codificam para topoisomerases II mais pequenas (1221 e 1232 aa por subunidade); no caso de *Plasmodium falciparum*, a topoisomerase II é uma enzima ligeiramente maior composta por 1397 aa por subunidade. A topoisomerase II α humana é significativamente maior que as enzimas homólogas parasitárias, apresentando 1530 aa por subunidade, um domínio N-terminal menor e um domínio C-terminal maior e as células eucariotas em proliferação têm níveis muito mais elevados de topoisomerase II α do que as células quiescentes ou altamente diferenciadas (Cheesman, 2000). Por outro lado, o seu nível enzimático nuclear sobe de forma constante entre a fase S e a métáfase, decrescendo muito rapidamente na anáfase e na telófase, o que sugere o seu envolvimento durante a mitose. O mesmo não se observa na isoforma β que mostra níveis de expressão semelhantes ao longo do ciclo celular (Andersen, Bendixen & Westergaard, 1996; Cheesman, 2000).

Nos tripanosomatídeos estas enzimas têm uma função adicional, pois localizam-se numa estrutura que não está presente nos eucariotas superiores, o cinetoplasto (Hanke *et al.*, 2003). O interesse científico pelas topoisomerases II parasitárias aumentou pelo facto de também serem essenciais à replicação do ADN presente no cinetoplasto. O silenciamento do ARN da topoisomerase II em *T. brucei* resultou em discinetoplastia, devido a uma ligação ineficiente dos minicírculos recém-formados à rede pré-existente (Das *et al.*, 2004). Estudos de imunofluorescência mostraram que a topoisomerase II de *L. infantum* localiza-se ao nível do cinetoplasto e do núcleo, atingindo maiores níveis de expressão na forma amastigota (intracelular) (Hanke *et al.*, 2003). A forma promastigota não revelou diferenças nos níveis de expressão desta proteína durante as fases logarítmica e estacionária de crescimento. Outro estudo sugere uma atividade aumentada desta proteína durante a fase logarítmica de proliferação de *L. infantum* e uma atividade catalítica reduzida durante a fase estacionária, devendo a atividade enzimática ser regulada por mecanismos pós-transducionais, já que os níveis de transcritos são semelhantes. Esta observação pode também ser explicada se considerarmos a existência de um *pool* inativo de ARNm num organelo subcelular não disponível ao sistema de tradução ou um mecanismo de degradação específico após a tradução da enzima. Por outro lado, a maior quantidade de ARNm na fase de invasão do hospedeiro pode ser importante após a fagocitose pelo macrófago e para a transformação em amastigota, visto que a sua sobrevivência depende da sua capacidade para realizar divisões rápidas. Apesar da quantidade do transcrito continuar a aumentar durante a forma amastigota,

pensa-se que, nas primeiras horas de colonização da célula hospedeira, o parasita recorra aos transcritos sintetizados durante a anterior forma promastigota.

Nos mamíferos, o silenciamento das topoisomerases de tipo II α altera a diferenciação neuronal, sendo imprescindível para a correta segregação cromossômica nos eucariotas superiores. Nas leveduras a ausência desta enzima aumenta as recombinações génicas indesejáveis (Hanke *et al.*, 2003). Nos tripanosomatídeos foram descritas as seguintes localizações da topoisomerase II: em *C. fasciculata* no ADN cinetoplastidial, em *T. cruzi* no núcleo (Hanke *et al.*, 2003; Das *et al.*, 2006b), em *T. brucei* no núcleo e no cinetoplasto (Kulikowicz & Shapiro, 2006), tal como em *L. donovani* e em *L. infantum* (Hanke *et al.*, 2003; Das *et al.*, 2006b). Estas diferenças de localização em organismos tão próximos podem explicar-se pelos diferentes epitopos que serão reconhecidos através dos poucos anticorpos disponíveis. Contudo, não se deve excluir a hipótese de existirem duas isoformas e/ou duas localizações nos diferentes protozoários anteriormente mencionados. Por exemplo, a topoisomerase II codificada por *L. infantum* (LiTOPII) localiza-se em dois locais antípodas que flanqueiam o ADN cinetoplastidial (Hanke *et al.*, 2003).

De um modo geral, assume-se que a atividade biológica destas enzimas nos protozoários é semelhante à descrita para os eucariotas (necessitam de ATP e de catiões bivalentes), com algumas exceções. Por exemplo, a topoisomerase tipo II de *T. cruzi* e *L. donovani* estão descritas como tendo atividade ATP-independente (Cheesman, 2000).

Em resumo, pelo facto da LiTOPII ter uma estrutura e localização semelhante às topoisomerases codificadas por outros organismos, a sua função deve mostrar-se conservada devendo, por isso, ser essencial à síntese dos ácidos nucleicos, à estabilidade genómica, à condensação e descondensação da cromatina e à segregação das cromátides-filhas de *Leishmania*. É igualmente de salientar o facto da sua sequência divergir moderadamente face às proteínas homólogas do hospedeiro vertebrado, o que a poderá tornar sensível a diferentes fármacos (Cheesman, 2000). Este aspeto pode e deve ser explorado e, nos últimos anos, o interesse por estas enzimas tem vindo a crescer não só por causa do seu papel fundamental no metabolismo celular, mas também por terem sido identificados novos fármacos que as poderão inibir seletivamente. Neste grupo incluem-se os antimicrobianos (fluoroquinolonas) e os agentes quimioterapêuticos (Das *et al.*, 2008).

1.4.3. Topoisomerases como Alvos Terapêuticos nos Protozoários

Para que as topoisomerases dos protozoários possam constituir bons alvos terapêuticos, estas enzimas devem apresentar uma homologia suficientemente distante das proteínas homólogas codificadas pelas espécies hospedeiras. Uma vez que a eficiência da inibição parasitária poderá estar relacionada com a quantidade de enzima disponível para a formação de complexos enzima-ADN, será importante considerar o padrão de expressão e a sua atividade biológica no desenho dos futuros protocolos terapêuticos (Chessman, 2000). A LiTOPII é codificada por um único gene cuja expressão difere ao longo do ciclo celular, existindo ainda a peculiaridade destas enzimas regular a conformação topológica do ADN cinetoplastidial em *Leishmania* e em tripanosomas (Hanke *et al.*, 2003).

Como já foi referido, devido à homologia parcial com as topoisomerases de outros eucariotas, estas moléculas são alvos bastante atrativos, uma vez que as diferenças apresentadas poderão resultar em sensibilidades diferentes a inibidores, proporcionando a possibilidade de desenvolver antiparasitários que atuem especificamente sobre estas enzimas parasitárias (Das *et al.*, 2004; 2008).

1.4.4. Classificação dos Inibidores de Topoisomerases

As topoisomerases bacterianas e de mamíferos de tipo I e II são inibidas por várias moléculas que estabilizam o complexo de clivagem ADN-topoisomerase, formado durante a primeira reação de transesterificação. As moléculas que atuam sobre as topoisomerases podem ser divididas em inibidores irreversíveis (“venenos”) e inibidores reversíveis (Chessman, 2000).

Os **inibidores irreversíveis** estabilizam o complexo topoisomerase-ADN induzindo a paragem da replicação e ativam a cascata da apoptose devido à toxicidade celular destes complexos. A enzima ao permanecer ligada ao ADN provoca a fragmentação irreversível do genoma e, conseqüente, morte celular. Nesta categoria incluem-se, por exemplo, as fluoroquinolonas inibidoras das girases bacterianas (figura 3), a camptotecina (inibidor da topoisomerase I de eucariotas), a novobiocina (inibidor da atividade ATPase das topoisomerases de tipo II bacterianas), a doxorubicina, o etoposido e o teniposido (inibidores das topoisomerases II eucariotas) (Chessman, 2000; Cortázar, Coombs & Walker, 2007; Das *et al.*, 2008).

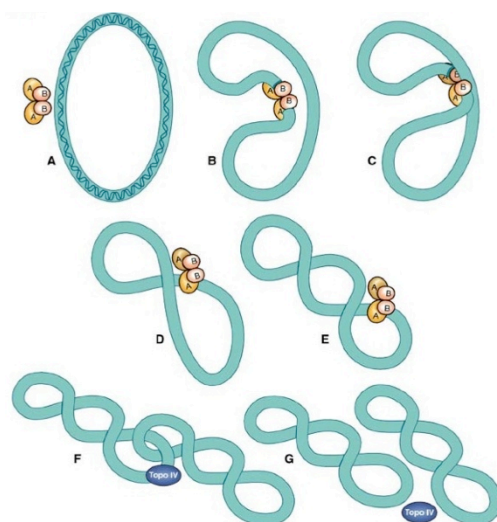


Figura 3: Funções das topoisomerases inibidas pelas fluoroquinolonas. A ADN girase provoca o relaxamento ou o superenrolamento do ADN através do corte de uma das cadeias, passagem da cadeia complementar e religação das extremidades (A-E). A topoisomerase IV permite a separação das cromátides-filhas (F e G) (Pallo-Zimmerman, Byron & Graves, 2010).

Os **inibidores reversíveis** exercem a sua ação inibitória antes da ligação da enzima ao substrato sem que ocorram quebras nas cadeias de ADN. Neste grupo estão incluídas as bisdioxopiperazinas e as cumarinas (Das et al, 2007).

Assim se percebe que, para os inibidores irreversíveis, a citotoxicidade aumente nas fases do ciclo celular em que os níveis das topoisomerases são mais elevados, enquanto que para os inibidores reversíveis se verifica o inverso. Portanto, a forma amastigota deverá mostrar-se hipersensível aos inibidores irreversíveis e, as formas promastigotas, mais sensíveis aos inibidores reversíveis (Das *et al.*, 2008).

1.4.5. Análise filogenética

A análise filogenética da topoisomerase II de *Leishmania* com as enzimas homólogas codificadas pelos mamíferos hospedeiros permite avaliar o grau de diferenciação entre estas e antecipar, caso exista uma distanciação apreciável, se novos fármacos ou moléculas já existentes poderão ser efetivas na inibição enzimática. Através da base de dados da UniProt (www.uniprot.org) foram alinhadas e comparadas as sequências aminoacídicas de alguns elementos pertencentes à família das topoisomerases II (Anexo 1), dos seguintes organismos e, respetivas, identificações proteicas: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (estirpe KF147) (D2BQ32), *Streptococcus thermophilus* JIM 8232 (F8LYS0), *Haemophilus haemolyticus* M21621 (F9GWX2), *Yersinia pestis* (Q0W9U2), *Crithidia fasciculata* (P27570), *Leishmania infantum* (A4HWL4), *Trypanosoma cruzi* (E7LM06), *Saccharomyces cerevisiae* (estirpe ATCC 204508/S288c) (P06786), *Mus musculus* (Q01320), *Canis familiaris* (F1Q2M4),

Equus caballus (F7CL38), *Homo sapiens* (Q71UH4). A partir de um alinhamento múltiplo gerou-se uma árvore filogenética (Figura 4) que será interpretada em seguida. A LiTOPII contém pequenas sequências encontradas entre todas as topoisomerases de tipo II estudadas, sendo as semelhanças maiores no domínio N-terminal e menores no domínio C-terminal. É possível observar que no processo evolutivo, os protozoários cinetoplastídeos foram os primeiros eucariotas a divergir (Das *et al.*, 2004).

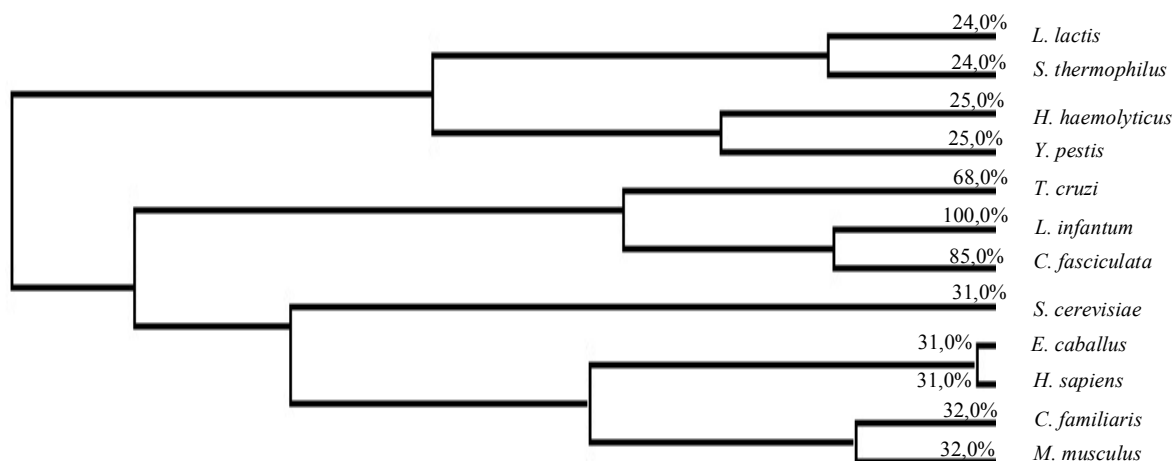


Figura 4: Árvore filogenética ilustrativa das distâncias evolutivas de alguns membros da família da topoisomerase II, que resultou da comparação das sequências aminoacídicas através da base de dados UniProt (www.uniprot.org). As espécies analisadas foram: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (estirpe KF147) (D2BQ32); *Streptococcus thermophilus* JIM 8232 (F8LYS0); *Haemophilus haemolyticus* M21621 (F9GWX2); *Yersinia pestis* (Q0W9U2); *Crithidia fasciculata* (P27570); *Leishmania infantum* (A4HWL4); *Trypanosoma cruzi* (E7LM06); *Saccharomyces cerevisiae* (estirpe ATCC 204508/S288c) (P06786); *Mus musculus* (Q01320); *Canis familiaris* (F1Q2M4); *Equus caballus* (F7CL38); *Homo sapiens* (Q71UH4).

Na figura 4 podem apreciar-se as semelhanças entre as sequências aminoacídicas das topoisomerases de *L. infantum*, de *C. fasciculata* e de *T. cruzi*, parasitas que expressam uma topoisomerase II com uma homologia de 85,0% e 68,0% relativamente à codificada por *L. infantum*. É de referir que a distância filogenética com as subunidades B das ADN girases de bactérias Gram-positivas (*L. lactis* subsp. *lactis* e *S. thermophilus* JIM 8232), cuja percentagem de homologia é de 24,0%, é ligeiramente inferior quando comparadas com as mesmas subunidades de Gram-negativas (*H. haemolyticus* M21621 e *Y. Pestis*) que mostram uma homologia de 25,0%. Quando comparada com os eucariotas, a LiTOPII apresenta uma homologia maior: *S. cerevisiae* (31,0%), *M. musculus* (32,0%), *C. familiaris* (32,0%), *E.*

caballus (31,0%) e *H. sapiens* (31,0%). Esta análise filogenética demonstra que a LiTOPII é divergente das restantes topoisomerasas II analisadas, constituindo assim um alvo interessante para investigação e desenvolvimento de novos fármacos.

A extensa homologia das sequências aminoacídicas das topoisomerasas II codificadas em várias espécies de *Leishmania* (Anexo 2) encontra-se esquematizada na figura 5. Após o alinhamento e comparação das sequências, a espécie mais distante de *L. infantum* é *L. braziliensis* com uma identidade de 93,0%, sendo a mais próxima *L. donovani* com 99,0% de homologia, seguindo-se *L. chagasi* com 98,0%, *L. major* e *L. mexicana* com 97,0%.

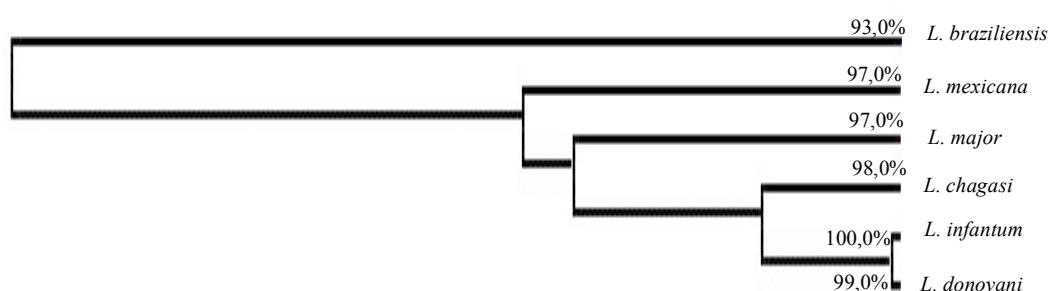


Figura 5: Árvore ilustrativa da percentagem de homologia da sequência aminoacídica da LiTOPII com algumas espécies de *Leishmania* spp.: *Leishmania braziliensis* (A4H891), *L. mexicana* (estirpe MHOM/GT/2001/U1103) (E9AQC1), *L. major* (Q4QF53), *L. chagasi* (O61078), *L. infantum* (A4HWL4), *L. donovani* (estirpe BPK282A1) (E9BCH0).

2. Leishmaniose

A Leishmaniose zoonótica visceral causada por *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*) é potencialmente fatal para o Homem e para os cães. Pensa-se que *L. infantum* foi exportada para as Américas pelos cães dos colonos durante o processo de colonização da América do Sul (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Esta zoonose também afeta zonas intertropicais da América e África, estendendo-se até às zonas temperadas da América Latina, Europa e Ásia. O período de incubação da doença varia entre 3 meses e 7 anos e a maioria dos cães infetados são assintomáticos (Gramiccia, 2011), sendo a prevalência da infeção bastante superior ao número de casos clínicos reportados (Miró, Cardoso, Pennisi, Oliva & Baneth, 2008).

Na espécie humana, a Leishmaniose tem manifestações clínicas diferentes das do Cão. A Leishmaniose visceral causada por *L. donovani* no Velho Mundo e por *L. infantum* no Velho e no Novo Mundo é a forma mais grave. Outras espécies causam Leishmaniose cutânea ou mucocutânea que, apesar de não serem fatais, são responsáveis por uma morbilidade considerável na população de áreas endémicas. A Leishmaniose humana pode ser dividida em

duas grandes categorias dependendo da fonte de infecção: na Leishmaniose zoonótica onde os hospedeiros reservatórios são animais domésticos e selvagens e na Leishmaniose antroponótica que é transmitida por via venérea ou por um inseto que se infetou noutro humano. Existem exceções a estas duas categorias, por exemplo, a Leishmaniose cutânea cujo agente é *L. tropica* que, normalmente, tem origem antroponótica, mas em alguns casos tem origem animal (WHO, 2010). WHO (2010) classificou a Leishmaniose humana como uma das doenças tropicais mais negligenciadas, com uma incidência anual que varia entre 1 a 1,5 milhões de novos casos clínicos cutâneos e 500 000 novos casos de Leishmaniose visceral. Na última década, a incidência global de Leishmaniose humana tem vindo a aumentar, apesar de ser difícil distinguir entre um aumento real e um aumento artificial causado pelos novos métodos de diagnóstico e pela obrigatoriedade das notificações. Contudo, é indiscutível que a Leishmaniose humana e animal têm uma distribuição geográfica mais alargada do que há algumas décadas; a transmissão de *Leishmania* tem sido registada em zonas não endémicas como alguns estados dos Estados Unidos da América e do Canadá e algumas zonas da Europa, como o norte de Itália e a Alemanha. De facto, a Leishmaniose é uma doença em expansão, provavelmente devido às mudanças ambientais, demográficas e ao comportamento humano (guerras ou conflitos sociais). Adicionalmente, alterações no habitat do hospedeiro natural ou dos vetores contribuem para a mudança do panorama da Leishmaniose.

Estudos experimentais demonstraram que os cães assintomáticos também acantonam o parasita no sangue, fígado, baço, linfonodos e pele, enquanto que os animais doentes apresentam maiores cargas parasitárias e uma vasta disseminação parasitária nos tecidos. A reinfeção experimental de cães permitiu observar que a exposição prévia pode conferir um certo grau de proteção e Solano-Gallego *et al.* (2009) admite a hipótese que, nas regiões endémicas, os cães possam ser reinfetados quando vivem no exterior, pois estão continuamente expostos a flebótomos infecciosos, podendo mesmo ser picados centenas de vezes durante uma só noite (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

2.1. Epidemiologia

Segundo Solano-Gallego *et al.* (2009) a Leishmaniose humana é a terceira doença mais importante a nível mundial, das que são transmitidas por vetores. Endémica em 98 países (WHO, 2010) sobretudo nas regiões tropicais e subtropicais e com uma população em risco estimada de 350 milhões de pessoas afeta, sobretudo, os meios rurais ou suburbanos mais empobrecidos. A WHO calcula que a prevalência mundial seja de 12 milhões de pessoas e uma incidência anual de 2 milhões de novos casos, sendo 0,5 milhões de Leishmaniose visceral e 1,5 milhões de Leishmaniose cutânea (Romão *et al.*, 2007; Solano-Gallego *et al.*,

2009). A Leishmaniose visceral deverá causar cerca de 59 000 mortes por ano (Solano-Gallego *et al.*, 2009). No que toca à co-infecção *Leishmania*/VIH, no sudoeste da Europa (Portugal, Espanha, Itália e França) haviam sido registados 2152 casos até 2006, sendo que Portugal contribuía com 223 casos (Campino & Maia, 2010). Estes autores afirmam que são registados anualmente 15 a 20 novos casos de Leishmaniose visceral em indivíduos imunocompetentes.

O Cão é um hospedeiro natural e um reservatório da infeção para o Homem, particularmente em pessoas com imunossupressão, idosos e crianças (Urquhart *et al.*, 1996). A Leishmaniose canina causada por *L. infantum* é diagnosticada na bacia Mediterrânica, no Médio Oriente, Ásia e América Latina. Segundo Bowman (1999) foram relatados casos no Texas, em Oklahoma e em Ohio e documentadas infeções em cães *Foxhound* no estado de Nova Iorque. Outros estudos revelaram que de 11 000 *Foxhounds* nos Estados Unidos e Canadá pertencentes a matilhas de caça, 12% apresentavam anticorpos anti-leishmania apesar da maioria não mostrar sinais clínicos. Não é claro como terá ocorrido a infeção destes animais, mas pensa-se que poderá acontecer quando estes são levados para caçadas em estados do sudeste onde são picados pelos flebótomos (Bowman *et al.*, 1999). Um inquérito serológico nos E.U.A. revelou que a infeção de cães por *Leishmania* está presente em 18 estados, ocorrendo a maioria dos casos na parte este da América do Norte (Bowman *et al.*, 1999) e em duas províncias do Canadá (Baneth *et al.*, 2008).

O Cão é um animal de companhia bastante comum, socializando com um grande número de famílias tanto em países desenvolvidos como em vias de desenvolvimento. Como já foi dito, no Velho Mundo, a espécie infetante mais importante é *L. infantum* (*syn. L. chagasi* na América Central e do Sul), apesar da infeção por outras espécies já ter sido diagnosticada no Cão. Nestes casos, o Cão não parece constituir um reservatório importante para a infeção dos humanos (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

Quando comparados com o Homem, o Cão parece ser mais suscetível a *L. infantum* e por isso desenvolve, frequentemente, quadros sintomatológicos mais graves (Gramiccia, 2011). A infeção de cães por *L. infantum* mostra-se endémica em cerca de 50 países (Europa, África, Ásia e nas Américas), apresentando valores de prevalência variáveis em função das condições climáticas e ecológicas que determinam a abundância de vetores (Solano-Gallego *et al.*, 2009). As seroprevalências descritas variam entre os 1,7% no sul do Chipre e os 40% no sul de Itália, sendo que a grande maioria de parasitas pertencem ao zimodemo MON-1 (Gramiccia, 2011). Estima-se que, pelo menos 2,5 milhões de cães, estejam infetados só no sudoeste da Europa (Portugal, Espanha, Itália e França) (Campino & Maia, 2010), o que representa cerca de 63 a 80% da população de canídeos (Baneth *et al.*, 2008), embora o

número de casos clínicos seja muito inferior. No caso de Portugal e segundo o ONLeish, as áreas que registam maior endemicidade incluem a região de Trás-os-Montes e Alto Douro, a sub-região da Cova da Beira (Belmonte, Covilhã e Fundão), o concelho da Lousã, parte dos concelhos de Alcanena e de Santarém, o concelho de Mação, os concelhos de Coimbra, de Arganil, de Proença-a-Nova e da Sertã, a região de Lisboa e Setúbal, o concelho de Évora e o Algarve (Pinto, 2012) (figura 6). O relatório de 2009 elaborado por esta entidade apontou uma prevalência média nacional de 6%, sendo que metade destes cães permaneciam, exclusivamente, fora de casa (Seixas *et al.*, 2011). As zonas de maior endemicidade em Portugal até à década de 80 foram: o Vale do Douro, a região de Lisboa e Setúbal e o Algarve (Pinto, 2012). Recentemente, um inquérito epidemiológico realizado na área da Grande Lisboa registou uma prevalência de infeção de 19,2%. No Algarve, um estudo de seroprevalência detetou a presença de anticorpos anti-leishmania em 28,8% dos animais analisados (Campino & Maia, 2010). Um outro estudo realizado entre 2010 e 2011 confirmou a presença da infeção em todas as regiões do país, exceto nos Açores e na Madeira. De salientar que nos vários estudos efetuados, a maioria dos cães infetados não apresentava sintomas, porque se encontravam no período de incubação da doença, tinham estado doentes e recuperado após o tratamento ou eram resistentes ao parasita (Pinto, 2012). Outras avaliações epidemiológicas, feitas na Região Metropolitana de Lisboa, revelaram uma maior prevalência de infeção canina nas áreas rurais (8,8%) do que nas áreas urbanas e sub-urbanas (3,8%), situação inversa da que ocorre nos humanos – fenómeno designado de desvio trófico – pois, apesar do vetor ter uma maior apetência para os animais, a menor relação animais/Homem na região urbana tornam-nos mais suscetíveis à infeção acidental (Campino & Maia, 2010).

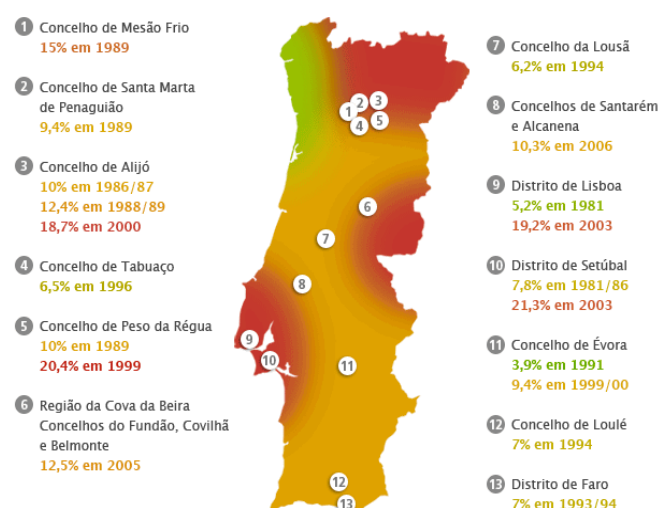


Figura 6: Infeção de Leishmaniose canina em Portugal (Fonte: ONLeish).

Uma investigação epidemiológica que recorre ao uso de técnicas moleculares de diagnóstico tem vindo a mostrar que a infeção nas regiões endémicas é generalizada, apesar de nem todos

os cães infetados desenvolverem doença. Segundo a WHO (2010), a percentagem de cães assintomáticos pode chegar a 50%, sendo que alguns destes podem desenvolver uma resposta imune eficaz contra o parasita. Estudos por PCR indicaram que a prevalência da infeção em áreas endémicas é muito superior à prevalência de animais doentes (Baneth *et al.*, 2008). Estes autores referem que o quadro clínico dos cães infetados pode evoluir de forma variada mas que, em alguns animais, os sinais de doença grave podem surgir logo após a infeção. Admite-se que os animais com doença grave sejam incapazes de desenvolver uma resposta imunitária celular eficaz, apesar de apresentarem uma forte resposta imunitária humoral que, no entanto, se revela prejudicial.

Outros animais podem permanecer infetados por um longo período, mas nunca apresentarem lesões ou doença clínica. No entanto, a administração de um fármaco imunossupressor ou uma doença imunossupressora concomitante pode levar à ativação da infeção latente e ao desenvolvimento de sinais clínicos. Caso estejam reunidas as condições ideais para a transmissão da doença (presença de vetor e de hospedeiro), o foco de infeção pode dispersar-se rapidamente. Os cães infetados podem ainda contribuir para a manutenção do parasita através dos raros, mas possíveis modos de transmissão não vetoriais (Baneth *et al.*, 2008).

Como já foi referido, a doença pode ser diagnosticada em cães de países não endémicos que tenham vivido ou contactado com animais de zonas endémicas. O número crescente de animais que viajam anualmente para o sul da Europa e o aumento do número de animais importados de zonas endémicas têm despertado uma forte preocupação relativamente à possibilidade de introdução de novas doenças em zonas não endémicas. Um estudo realizado na Holanda indica que, anualmente, cerca de 58 000 cães viajam com os seus donos para o sul da Europa durante as férias, sendo o risco de contrair Leishmaniose de 0,027-0,23% (Solano-Gallego *et al.*, 2009). A infeção por *Leishmania* foi igualmente descrita em cães que nunca viajaram mas que se relacionaram com animais importados, crias de mães infetadas ou que receberam transfusões de animais infetados (Baneth *et al.*, 2008). Atualmente, sabe-se que a infeção por *L. infantum* já se encontra disseminada pelo norte da Europa, estando presente no norte da Itália, nos Alpes e nos Pirinéus. A proximidade de cães infetados a humanos promove a transmissão da doença entre espécies, mas a existência de um cão infetado em casa não parece aumentar o risco de infeção da família, pelo menos de uma forma estatisticamente significativa. Por outro lado, a eliminação de cães seropositivos no Brasil, por abate compulsivo, tem mostrado resultados discutíveis na diminuição da infeção humana e vários relatórios alegam que, a longo prazo, não será eficaz no decréscimo da infeção humana ou animal (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

2.2. Patogénese e lesões

Leishmania é responsável por um conjunto de doenças cujos sintomas variam de lesões cutâneas (autolimitantes em alguns casos), a lesões viscerais que, quando não são tratadas, podem tornar-se fatais. A sintomatologia clínica da Leishmaniose e a sua evolução variam em função das espécies hospedeiras e parasitária. A Leishmaniose é uma doença multissistémica que pode afetar qualquer órgão, tecido ou fluido biológico e que se manifesta, inicialmente, por sinais clínicos inespecíficos (Romão *et al.*, 2007; Solano-Gallego *et al.*, 2009). Apresenta, no entanto, três características patogénicas constantes: a célula alvo do parasita é o macrófago; a resposta imunitária condiciona o estabelecimento e o desenvolvimento da doença; e os órgãos mais afetados são geralmente ricos em células do sistema monocítico-fagocitário (Gramiccia, 2011).

Após a inoculação, os promastigotas ligam-se a uma variedade de recetores macrofágicos para induzirem a sua fagocitose e ativarem diferentes respostas celulares que contribuem para o sucesso da infeção. Alguns autores defendem que os promastigotas infetam inicialmente os neutrófilos, visto ser esta a primeira população celular a chegar ao local da inoculação. Estes, após sofrerem subsequentemente apoptose, são fagocitados pelos macrófagos sem que os mecanismos microbicidas sejam ativados, permitindo a diferenciação em amastigotas e sua posterior replicação (McConville & Handman, 2007). Os parasitas resistem à morte no interior do macrófago graças a vários fatores de virulência (lipofosfoglicano – LPG, a metaloprotease glicoproteína de 63 kDa – GP63, etc.) que são expressos na superfície do parasita e que fixam as opsoninas, promovendo a fagocitose macrofágica. Simultaneamente, ocorre a libertação de citocinas por parte do macrófago que modulam e regulam a resposta imunitária anti-leishmania. Os cães resistentes à doença ativam subpopulações de linfócitos T_H1 produtores de $IFN-\gamma$ que estimulam os mecanismos leishmanicidas dos macrófagos. Nos animais suscetíveis, a resposta T_H2 é predominante, ocorrendo uma forte resposta humoral que é pouco eficiente. Nestes casos, os órgãos linfóides apresentam uma depleção de células T e uma proliferação exagerada de células B (Santos-Gomes & Pereira da Fonseca, 2008). Desta forma, os amastigotas encontram condições para se disseminarem, podendo provocar lesões cutâneas, vasculite generalizada, hiperplasia linforeticular, hiperglobulinémia e deposição de imunocomplexos nas articulações e nos glomérulos renais (Sherding, 2006). Contudo, em alguns animais, os macrófagos infetados são destruídos pelas células plasmáticas e linfócitos e o animal consegue recuperar. Esta recuperação parece depender do tipo de imunidade mediada por estas células e pelo facto de não ocorrerem lesões que levem a um aumento crónico do baço, fígado, linfonodos e lesões cutâneas persistentes (Urquhart *et*

al., 1996). Portanto, as infecções assintomáticas podem corresponder a uma fase inicial da doença ou a um animal resistente que recuperou espontaneamente (Gramiccia, 2011).

Os sinais clínicos encontrados no exame físico podem ser: febre intermitente, perda de peso crônica e progressiva sem diminuição de apetite, caquexia, vômitos, diarreia, melena, letargia, hepatoesplenomegália, linfadenomegália local ou generalizada, seborreia seca, dermatite ulcerativa ou granulomatosa caracterizada por uma alopecia facial não-prurítica, hiperqueratose, calcificação, úlceras mucocutâneas e nódulos intradérmicos (focinho, orelhas e almofadas plantares), onicogribose, uveíte anterior, conjuntivite e blefarite, tosse, espirros (rinite), epistaxe, anemia, icterícia, glomerulonefrite, poliúria, polidipsia, insuficiência renal, poliartrite neutrofílica e claudicação. O animal pode ainda apresentar uma anemia não regenerativa, leucocitose ou leucopenia, trombocitopenia, hiperglobulinemia e hipoalbuminemia, azotemia renal ou aumento das enzimas hepáticas (Simões, 2012). Estes sinais inespecíficos tornam o diagnóstico diferencial bastante difícil, que se complica ainda mais quando ocorrem períodos de remissão (Sherding, 2006; Solano-Gallego *et al.*, 2009). De seguida, são detalhadas com um maior pormenor as lesões causadas pelo parasita nos vários órgãos geralmente afetados.

2.2.1. Lesões Cutâneas

As lesões cutâneas são as mais comuns em cães com Leishmaniose, podendo ser acompanhadas de outros sinais clínicos e/ou de alterações nos exames complementares. Estão descritos vários tipos de lesões cutâneas: dermatite esfoliativa não pruriginosa com ou sem alopecia e que pode ter localização no focinho, orelhas e membros ou ser generalizada; dermatite ulcerativa nas saliências ósseas, junções mucocutâneas, extremidades dos membros, bordos do pavilhão auricular; dermatite nodular focal ou multi-focal; dermatite proliferativa mucocutânea e dermatite papular (Urquhart *et al.*, 1996). O quadro histopatológico cutâneo mais comum varia entre nódulos perianexiais e uma dermatite difusa granulomatosa ou piogranulomatosa com hiperqueratose ortoqueratótica ou paraqueratótica, acantose, crostas e ulceração (Baneth *et al.*, 2008). Contudo, outros padrões histopatológicos também estão descritos como a dermatite pustular subcórnea, a dermatite liquenóide, a vasculite e a paniculite. A piodermatite estafilocócica superficial ou profunda é uma complicação que se observa com alguma frequência. Manifestações cutâneas como despigmentação, erupção pustular, alopecia de tipo *areata* ou pênfigo de tipo foliáceo e eritema multiforme são relativamente raras (Solano-Gallego *et al.*, 2009). A avaliação da matriz extracelular cutânea em cães sintomáticos mostrou uma redução no colagénio de tipo I e um aumento no colagénio de tipo III proporcional à gravidade da lesão e à destruição tecidual. As lesões dérmicas não

são, necessariamente, provocadas pela reação inflamatória à presença dos parasitas, uma vez que a pele normal de cães sintomáticos, contém um grande número de parasitas (Baneth *et al.*, 2008).

2.2.2. Lesões Oculares

A prevalência de lesões oculares e perioculares varia entre os 16 e os 80% em cães sintomáticos (Baneth *et al.*, 2008; Solano-Gallego *et al.*, 2009). Em 16% dos casos clínicos, as lesões oculares são a principal queixa e a única manifestação presente (Baneth *et al.*, 2008; Solano-Gallego *et al.*, 2009). As lesões mais comuns são: a conjuntivite, a blefarite (esfoliativa, ulcerativa ou nodular), a uveíte anterior e a queratoconjuntivite simples (comum ou seca) ou mista. As consequências oculares da hipertensão sistêmica (descolamento da retina e/ou hemorragias, tortuosidade arterial da retina e hifema) foram observadas em apenas 5,7% dos cães com Leishmaniose clínica (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Estes autores referem que a histopatologia ocular realizada a 60 cães com Leishmaniose mostrou uma inflamação linfoplasmocítica e/ou granulomatosa de padrão perivascular, nodular ou difuso e a presença do parasita nos tecidos oculares (56,2%), particularmente, na conjuntiva, no limbo e no corpo ciliar. Nos casos de queratoconjuntivite seca, os infiltrados inflamatórios localizados à volta dos ductos lacrimais causam retenção de secreção e diminuição de produção lacrimal (Baneth *et al.*, 2008).

2.2.3. Lesões Renais

Nos animais infetados, a avaliação da função renal e o estadiamento da eventual lesão através das recomendações da *International Renal Interest Society* (IRIS) são fundamentais uma vez que a Leishmaniose canina está associada a uma elevada prevalência de doença renal crónica (DRC). O diagnóstico precoce da lesão renal é benéfico e ajuda a prolongar a qualidade de vida do paciente. De salientar que a doença renal pode ser a única manifestação clínica e que esta pode progredir de uma proteinúria assintomática até um síndrome nefrótico ou a uma insuficiência renal crónica com glomerulonefrite, nefrite tubulointersticial ou, mais raramente, amiloidose. A insuficiência renal crónica é uma manifestação grave da doença e é a principal causa de morte na Leishmaniose canina (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Um estudo no Brasil com 55 cães seropositivos, identificou glomerulonefrite em todos (13 eram assintomáticos), nefrite intersticial em 78% e deposição de antigénio em 91% dos animais avaliados (Baneth *et al.*, 2008). Apesar da prevalência da lesão renal ser elevada, só se observa azotémia, com aumento da creatinina e da ureia, quando uma larga maioria dos nefrónios não funciona, o que só acontece numa fase terminal da doença.

A glomerulonefrite está associada à deposição de imunocomplexos ao nível da membrana glomerular e é, geralmente, membranoproliferativa e/ou mesangioproliferativa. A glomerulonefrite membranoproliferativa é o tipo de lesão mais frequente, enquanto os cães assintomáticos apresentam, normalmente, lesões mesangioproliferativas ou lesões mínimas de glomerulonefrite. Também estão descritos outros padrões histológicos de lesão glomerular (membranosa, segmentar, focal ou crónica) menos frequentes (Baneth *et al.*, 2008; Solano-Gallego *et al.*, 2009).

2.2.4. Lesões do Sistema Musculo-Esquelético

A atrofia muscular progressiva está associada à polimiosite crónica desencadeada pela presença de infiltrados mononucleares com formas amastigotas, vasculite neutrofílica e deposição de imunocomplexos IgG a nível muscular (Baneth *et al.*, 2008).

Lesões ósseas e articulares são frequentes em cães infetados, sendo a poliartrite erosiva e a não erosiva comuns. No líquido sinovial é possível identificar a presença de formas amastigotas. Um estudo em 58 cães com Leishmaniose revelou que 45% destes apresentavam claudicações (Baneth *et al.*, 2008); os ossos afetados mostravam, frequentemente, lesões proliferativas e de periosteíte, não raramente com osteólise cortical e medular (Baneth *et al.*, 2008; Santos-Gomes & Pereira da Fonseca, 2008).

2.2.5. Lesões nos Linfonodos, baço e medula óssea

A hipertrofia dos linfonodos é muito frequente, em particular, a dos linfonodos mandibulares, cervicais, pré-escapulares, axilares e poplíteos. Todos eles ou, apenas um, podem apresentar alterações não só de tamanho mas também de consistência (aumentada), apresentando-se contudo indolores. Simultaneamente ocorre deposição de hemossiderose que lhes confere uma cor acastanhada. Com o decorrer da doença há, no entanto, regressão da adenopatia (Santos-Gomes & Pereira da Fonseca, 2008).

Durante a fase aguda da doença, os órgãos linfóides (linfonodos e baço) desenvolvem uma hiperplasia linfóide reativa juntamente com uma hiperplasia monocítica da medula óssea e do baço (Santos-Gomes & Pereira da Fonseca, 2008). Esta hiperplasia é provocada por um aumento do número e do tamanho dos folículos linfóides e por uma marcada hipertrofia e hiperplasia dos macrófagos presentes nos cordões e nos seios medulares. A carga parasitária presente nos linfonodos normalmente não está correlacionada com o tipo e com a gravidade das lesões noutros órgãos (Baneth *et al.*, 2008). Por outro lado, a esplenomegália está relacionada com o aumento do número e do tamanho dos monócitos e dos macrófagos e com mudanças na estrutura microvascular tais como: o desaparecimento quase total dos capilares

sinusóides que envolvem a polpa branca, o abundante desenvolvimento de vénulas pulpaes e o aumento das fibras reticulares. Este processo parece servir para impedir ou atrasar a passagem de sangue e, conseqüentemente, do parasita através do órgão, funcionando como uma espécie de barreira, de forma a conceder o tempo necessário para que se estabeleçam os mecanismos imunológicos (Baneth *et al.*, 2008; Santos-Gomes & Pereira da Fonseca, 2008). Assim, na fase aguda, observa-se o desenvolvimento da polpa vermelha, com proliferação de macrófagos e de plasmócitos e uma diminuição do número de linfócitos. Já na fase crónica, o baço surge atrofiado com uma consistência aumentada e uma cápsula espessada (Santos-Gomes & Pereira da Fonseca, 2008). Por fim, a medula óssea apresenta uma consistência mais fluída e uma cor avermelhada. Microscopicamente, observa-se uma mielopatia involutiva e não regenerativa com depleção das linhas eritroblástica, leucoblástica e megacarioblástica e um número maior de plasmócitos acompanhado de hemosiderose (Santos-Gomes & Pereira da Fonseca, 2008).

As alterações na **hemóstase primária e secundária** descritas na Leishmaniose canina e que se traduzem nos sinais de epistaxe, hematúria e melena incluem alterações da agregação plaquetária, diminuição da atividade dos fatores de coagulação e fibrinólise. A epistaxe pode mesmo ser o único sinal de doença e causar a morte do animal por perda incontável de sangue. O mecanismo subjacente envolve uma rinite piogranulomatosa ou linfoplasmocítica – com ou sem ulceração – trombocitopenia e hiperglobulinemia. A anemia está presente na maioria dos animais sintomáticos devido à doença renal, que se agrava pela perda de sangue e/ou pela destruição imunomediada dos eritrócitos (Baneth *et al.*, 2008; Solano-Gallego *et al.*, 2009). Através de exames complementares adicionais podem, por vezes, ser detetadas: proteinúria renal persistente (razão proteína urinária/creatinina urinária $\geq 0,5$) e/ou azotemia renal, anemia não-regenerativa, leucocitose ou leucopenia, hiperproteinemia sérica, hiperglobulinemia policlonal β e γ , hipoalbuminemia, diminuição da relação albumina/globulina e aumento da atividade das enzimas hepáticas (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

2.3. Resposta imunitária

Como já foi referido, nem todos os animais infetados com *L. infantum* desenvolvem sintomatologia clínica, sendo que a infeção não significa doença. No passado, os clínicos e os investigadores classificavam os animais infetados em: assintomáticos, oligossintomáticos e polissintomáticos de acordo com o exame físico. Esta classificação tinha um valor limitado, pois não considerava as alterações clinicopatológicas e negligenciava a disfunção orgânica difusa sem manifestação aparente. Recentemente, Solano-Gallego *et al.* (2009) definiu uma nova classificação baseada nos sinais clínicos e/ou alterações clinicopatológicas e na confirmação da infeção por *L. infantum*. E, assim, cães com infeção subclínica ou assintomáticos são aqueles que, estando infetados por *L. infantum*, não apresentam sinais clínicos nem alterações nos exames complementares de diagnóstico (hemograma, bioquímicas e urianálise). Os animais com doença ativa são seropositivos, apresentando sinais clínicos e/ou alterações nos exames complementares (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Segundo Solano-Gallego *et al.* (2009), vinte e dois por cento dos cães infetados são suscetíveis de desenvolver doença devido a uma resposta imune celular inapropriada e à presença de uma resposta humoral que, mais tarde, acarreta o desenvolvimento de sinais clínicos e/ou alterações clinicopatológicas. Quarenta e sete por cento dos animais infetados são considerados resistentes devido à presença de uma resposta celular robusta contra *Leishmania*; 27% apresentaram resposta celular e humoral e 20% apenas uma resposta celular. De salientar que a infeção subclínica não é necessariamente permanente e que fatores como a imunossupressão e doenças concomitantes podem romper o equilíbrio e precipitar a progressão da doença, tal como nos humanos co-infetados pelo vírus da imunodeficiência humana (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

Uma vez inoculado, o parasita encontra a corrente sanguínea e acantona-se nos linfonodos, medula óssea, baço e fígado onde, ao multiplicar-se, pode provocar doença (Alexandre-Pires *et al.*, 2010). Inicialmente, o protozoário infeta os macrófagos perto do local de inoculação através da sua ligação a várias classes de recetores macrofágicos que promovem a fagocitose, como por exemplo: o recetor Fc, os recetores de complemento, a fosfatidilserina e, no caso das células dendríticas, o DC-SIGN (*Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*) (McConville & Handman, 2007). Em seguida, os parasitas invadem as células do sistema mononuclear fagocitário de todo o organismo (Roberts & Janovy, 2009), contribuindo para que os macrófagos desempenhem um papel fundamental no controlo da infeção de *Leishmania*. Citoquinas como o IFN- γ , a IL-2 e o TNF- α são libertadas pelos linfócitos T ativados, induzindo a ativação dos mecanismos leishmanicidas do macrófago. O óxido nítrico é considerado a principal molécula envolvida na apoptose dos

amastigotas (Baneth *et al.*, 2008). No entanto, no fagolisossoma, os amastigotas têm a capacidade de modular diferentes vias de sinalização da célula hospedeira, sendo a infecção capaz de suprimir a produção de superóxido e de óxido nítrico no macrófago e de inibir a secreção de IL-12 necessária à diferenciação de linfócitos T_H1 protetores. Adicionalmente, a secreção de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 e o TGF- β está aumentada (McConville & Handman, 2007).

Com efeito, McConville e Handman (2007) consideram que *Leishmania* modifica o metabolismo macrofágico de forma a facilitar o acesso dos parasitas aos nutrientes. As alterações no metabolismo da célula hospedeira influenciam a taxa de multiplicação dos amastigotas através, por exemplo, da estimulação dos macrófagos com IL-4 que eleva os níveis de arginina e serina intracitosólicos (McConville & Handman, 2007).

Na Leishmaniose canina têm sido descritas uma ampla gama de respostas imunes (Solano-Gallego *et al.*, 2009), apesar da sua imunopatogênese estar dividida em dois tipos principais de resposta; a resposta T_H1 associada ao controlo da infecção através da libertação de IFN- γ , IL-2 e TNF- α pelos macrófagos; ou a resposta predominantemente humoral e não protetora, com uma reduzida imunidade celular e expressão de citocinas do tipo T_H2 (Solano-Gallego *et al.*, 2009; Alexandre-Pires *et al.*, 2010).

O tipo de resposta que o hospedeiro vertebrado desenvolve tem, sobretudo, uma dependência genética. Hoje em dia sabe-se que, também na Leishmaniose visceral humana, a base genética é crítica nos casos de elevada suscetibilidade à doença e que implica vários mecanismos e, consequente modulação de genes como o da IL-4 e do recetor do IFN- γ . No Cão, estudos epidemiológicos sugerem um papel importante da genética nos casos em que ocorre resistência à doença. Uma raça autóctone das ilhas Baleares, o *Ibizian Hound* (Galgo das Ilhas Baleares), desenvolve uma resposta imune celular primária protetora e, por conseguinte, raramente desenvolvem doença clínica. Até agora, foram identificados dois genes que poderão regular a suscetibilidade do Cão à Leishmaniose: um haplótipo das moléculas de classe II do complexo *major* de histocompatibilidade (MHCII), presente no alelo DLA-DRB1*01502, e vários haplótipos do gene canino *Slc11a1* (*Solute carrier family 11 member a1*) (Solano-Gallego *et al.*, 2009). A importância deste último gene também já foi descrita na população humana, onde polimorfismos num único nucleótido da região promotora do gene *Slc11a1* estão associados ao desenvolvimento de doença. Contudo, a resistência ou a suscetibilidade do hospedeiro à doença deverá depender de uma multiplicidade de genes e de vários outros fatores como: o estado nutricional, as infeções concomitantes, o parasitismo, a patogenicidade do parasita e a exposição prévia à *Leishmania* (Baneth *et al.*, 2008).

2.3.1. Fatores predisponentes

Não se compreende ao certo como a idade, o género, a condição corporal, a genética do hospedeiro, as co-infecções e/ou doenças concomitantes, as condições imunossupressoras, as citocinas presentes, a carga parasitária, a patogenicidade da espécie de *Leishmania*, as infecções anteriores e o modo de transmissão podem afetar a progressão clínica da doença. Algumas raças parecem ser mais suscetíveis à doença, como por exemplo: o Boxer, o Cocker Spaniel, o Rottweiler e o Pastor Alemão, enquanto outras, como o *Ibizian Hound* (Galgo das Ilhas Baleares), raramente desenvolvem sinais clínicos. A idade parece ser um fator muito relevante, pois foram descritos picos de maior prevalência em cães com menos de 3 anos ou com mais de 8 anos, provavelmente, devido à fragilidade biológica do sistema imunitário. Não é atribuída relevância ao género havendo, contudo, estudos que apontam um risco acrescido de infecção aos machos (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Por outro lado, a via de infecção parece ser crítica no grau de ativação macrofágica; a inoculação intradérmica de promastigotas conduz a uma infecção subclínica, ao passo que a inoculação de amastigotas por via endovenosa induz uma doença grave (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

2.3.2. Imunidade Celular

A imunidade protetora é conferida, em grande parte, por linfócitos T que são críticos na fagocitose dos macrófagos, na apresentação e no reconhecimento dos antígenos, na subsequente ativação dos mecanismos leishmanicidas e na produção de citocinas. Recentemente, a resistência à infecção por *Leishmania* foi associada ao predomínio da subpopulação de células T CD4⁺, à produção de IFN- γ e de IL-2 (Santos-Gomes & Pereira da Fonseca, 2008). Na maioria dos casos, *L. infantum* induz respostas mistas T_H1 e T_H2 estando a replicação do parasita, a progressão da doença ou a sua cura dependente do tipo de resposta para a qual pende mais esta “balança”. Nos cães naturalmente infetados, os níveis de expressão de IFN- γ na medula óssea e baço são semelhantes entre animais sintomáticos e assintomáticos, enquanto os macrófagos de sangue periférico mostram níveis mais elevados de IFN- γ e de IL-4 nos animais assintomáticos (Baneth *et al.*, 2008). Nos animais sintomáticos, as subpopulações mononucleares presentes no sangue periférico mostram alterações pouco expressivas no nível destas citocinas, justificando os baixos níveis de apresentação antigénica e de ativação dos linfócitos CD4⁺ (Santos-Gomes & Pereira da Fonseca, 2008).

A IL-10, que também é considerada uma citocina importante na regulação da atividade dos linfócitos T efetores e na redução da atividade microbiana em macrófagos infetados, tem sido estudada em cães infetados com *Leishmania*. Nestes foi detetada a sua sobreexpressão no baço,

proporcional à carga parasitária e à gravidade do estado clínico. Baneth *et al.* (2008) refere que o padrão de expressão de citocinas e de quimiocinas no baço apresenta uma elevação inicial de IL-4 (um mês após a infecção) seguindo-se um aumento de IFN- γ . Os níveis de expressão das citocinas no sangue sobem na fase inicial assintomática, para depois diminuírem durante o período silencioso, ocorrendo um curto período de expressão de citocinas do tipo T_H1 antes do surgimento dos sinais clínicos. A base celular e os mecanismos desenvolvidos pela falta de resposta das células T à Leishmaniose canina não são totalmente conhecidos. A maioria dos cães infetados desenvolvem imunidade celular específica diagnosticada, *in vivo*, pela resposta positiva ao teste intradérmico que indica uma reação de hipersensibilidade retardada (hipersensibilidade tipo IV) (Baneth *et al.*, 2008; Santos-Gomes & Pereira da Fonseca, 2008). Todavia, nos animais sintomáticos é frequente a inexistência de reação de hipersensibilidade retardada, enquanto que os animais assintomáticos apresentam frequentemente uma resposta positiva (Santos-Gomes & Pereira da Fonseca, 2008). À medida que a doença progride nos cães suscetíveis, esta reação parece diminuir. Foi então postulado que o decréscimo da imunidade celular ao parasita é devida à depleção das células T CD4⁺ periféricas ou à diminuição da expressão de moléculas co-estimulantes como a B7 (Baneth *et al.*, 2008); de facto, os animais infetados têm um baixo número de células T, ausência de linfoproliferação específica e uma depleção acentuada de células T CD4⁺.

A ativação dos linfócitos T é iniciada pelo reconhecimento dos antígenos de *Leishmania* na superfície de células apresentadoras de antígenos através do MHCII e, para que tal aconteça, é necessária a participação adicional de moléculas co-estimulantes. Infelizmente, os macrófagos de cães infetados apresentam uma redução no número destas moléculas, o que diminui a sua capacidade para interagir com células T e, consequentemente, com a expressão de IFN- γ . A síntese de IFN- γ iria contribuir na destruição de parasitas através da ativação dos mecanismos leishmanicidas macrofágicos (Alexandre-Pires *et al.*, 2010), com a produção de óxido nítrico. De um modo geral, pode-se afirmar que as citocinas associadas à resposta T_H1 induzem a produção de óxido nítrico e as do perfil T_H2 inibem-na (Romão *et al.*, 2007). Adicionalmente, as células T CD8⁺ também parecem ter um papel importante na proteção em cães assintomáticos (Alexandre-Pires *et al.*, 2010) por modularem a libertação de IFN- γ promovendo, com isso, a destruição de macrófagos parasitados (Santos-Gomes & Pereira da Fonseca, 2008). A compreensão do perfil das citocinas expressas na Leishmaniose canina é uma tarefa difícil devido ao grande número de estádios clínicos, às diferentes respostas nos diferentes tecidos infetados e às diferenças entre a infecção natural e a experimental (Baneth *et al.*, 2008).

2.3.3. Imunidade Humoral

A Leishmaniose canina está associada a uma intensa resposta humoral que não é protetora (Baneth *et al.*, 2008). Após a ligação ao antígeno, os linfócitos B multiplicam-se e diferenciam-se em plasmócitos produtores de anticorpos, implicando um aumento dos órgãos linfóides e o desenvolvimento de sinais clínicos (Santos-Gomes & Pereira da Fonseca, 2008). Assim se compreende que os níveis de imunoglobulinas específicas sejam mais elevados nos animais sintomáticos do que nos assintomáticos, apesar destes últimos desenvolverem anticorpos anti-leishmania que se mantêm por um longo período de tempo sem que a doença se instale. Nos cães sintomáticos, a elevada concentração de imunoglobulinas circulantes pode induzir a formação de imunocomplexos, que acabam por se depositar nas paredes dos vasos e nas membranas basais, com consequências clínicas negativas para o animal (Santos-Gomes & Pereira da Fonseca, 2008). Vários estudos foram realizados para avaliar os níveis de IgG1 e IgG2 caninas de forma a estabelecer uma correlação entre a concentração da subclasse, o tipo de resposta T_H e o quadro clínico, contudo, não existem resultados conclusivos (Baneth *et al.*, 2008). Em termos gerais, a doença crónica está associada à exacerbação da resposta humoral ou a uma total anergia da resposta imune do hospedeiro, que se traduz na sua incapacidade em controlar a infeção (Romão *et al.*, 2007).

2.4. Mecanismos de evasão de *Leishmania*

A resistência dos promastigotas metacíclicos aos mecanismos do complemento prende-se com a incapacidade deste atingir a superfície do parasita, devido ao alongamento da cadeia do fosfoglicano membranar. Paralelamente, foi descrita, para algumas cinases proteicas de *Leishmania*, a capacidade de fosforilarem componentes do complemento inibindo, assim, a sua via clássica e alternativa. Por exemplo, a metaloprotease GP63 acelera a conversão da fração C3b em C3bi, ativando a migração de macrófagos para o local de infeção (Mehlhorn, 2001), a fagocitose através do recetor CR3 e a inativação do complexo de ataque à membrana. A ligação do protozoário ao recetor do complemento CR3 também reduz a produção de radicais de oxigénio pelo macrófago (Santos-Gomes & Pereira da Fonseca, 2008). Por outro lado, o LPG do protozoário inibe a fusão fagossoma-endossoma, a produção de radicais hidroxilo e de aniões superóxido (Mehlhorn, 2001), facilitando a diferenciação dos promastigotas em amastigotas (Santos-Gomes & Pereira da Fonseca, 2008).

Outro mecanismo pelo qual *Leishmania* influencia a resposta imune do hospedeiro é a modulação de citocinas. As diferentes espécies de *Leishmania* favorecem a expressão de TGF- β que inibe os mecanismos de defesa anti-leishmania dos macrófagos, agravando os sintomas. Simultaneamente, a supressão seletiva de IL-12 produzida pelos macrófagos é

mediada pelos fosfoglicanos do parasita e parece ser importante no atraso da ativação dos mecanismos T_H1 protetores do hospedeiro. Por fim, quer o processamento, quer a apresentação antigénica são afetados pelo parasita a nível pós-transcricional; a subexpressão das moléculas de classe II do MHC resulta da captura e da degradação acelerada dos seus RNA mensageiros (Mehlhorn, 2001).

2.5. Diagnóstico

O diagnóstico molecular/parasitológico é, normalmente, realizado para confirmar a doença. No entanto, testes de diagnóstico podem ser realizados em estudos epidemiológicos, na identificação de cães assintomáticos (em zonas endémicas), durante a importação de cães oriundos de regiões endémicas e na monitorização da resposta ao tratamento. Assim, é importante separar a infeção assintomática da doença e aplicar as diferentes técnicas de diagnóstico disponíveis, consoante as necessidades (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Para o diagnóstico definitivo da Leishmaniose, é fundamental uma abordagem integrada que inclua uma história pregressa meticulosa, um rigoroso exame físico, exames complementares (hemograma completo, bioquímica sanguínea, eletroforese proteica e urianálise) e testes laboratoriais específicos para a deteção direta do parasita, do seu ADN ou de anticorpos específicos (Simões, 2012).

2.5.1. História clínica e exame físico: qualquer raça pode ser afetada, mas algumas parecem apresentar maior predisposição. Por outro lado, os machos são infetados mais frequentemente do que as fêmeas, possivelmente, por diferenças comportamentais. Os cães podem contrair este parasita em qualquer idade mas, como já foi referido, a infeção é mais prevalente em animais com menos de 3 anos e mais de 8. Através da anamnese, o médico veterinário pode decidir se a Leishmaniose deve ou não ser incluída no diagnóstico diferencial e, só depois, efetuar os testes apropriados. Os sinais clínicos mais comuns são: a linfadenomegália local ou generalizada, a hepatoesplenomegália, a perda de peso, a epistaxe, as lesões oculares, a onicogrifose, as lesões cutâneas e as claudicações (Gramiccia, 2011).

2.5.2. Exames laboratoriais para parâmetros biológicos inespecíficos: incluem hemograma completo, parâmetros bioquímicos, eletroforese proteica e urianálise (Gramiccia, 2011). No caso de um animal surgir com uma história pregressa e sinais clínicos compatíveis com Leishmaniose, o primeiro passo poderá ser o hemograma, a urianálise e os testes serológicos específicos; conforme os resultados obtidos, podem ser requisitados outros exames complementares. Se a identificação citológica do parasita resulta num diagnóstico

definitivo, um resultado negativo obriga à realização de testes serológicos específicos num animal suspeito (Simões, 2012).

2.5.3. Diagnóstico parasitológico: *Leishmania* é um parasita dimórfico que apresenta um cinetoplasto intracelular junto à base do flagelo. Uma vez que todas as espécies de *Leishmania* apresentam uma elevada homogeneidade de características morfológicas, as técnicas descritas, em seguida, apenas permitem identificar o parasita até ao género (Gramiccia, 2011).

- **Exame citológico:** o isolamento e a identificação de amastigotas pode ser realizado a partir de biópsias obtidas de diversos tecidos (pele, linfonodos, medula óssea, baço) (Gramiccia, 2011). Os esfregaços de linfonodos ou de medula óssea mostraram ser uma técnica específica e barata no diagnóstico da Leishmaniose ativa, apesar de nos cães assintomáticos a sua sensibilidade ser bastante inferior (<30%) (Miró, Cardoso, Pennisi, Oliva & Baneth, 2008). Ao exame citológico (aspirado ou esfregaço de aposição), as características do infiltrado inflamatório são do tipo piogranulomatoso, granulomatoso e/ou linfoplasmocítico, à semelhança do exame histopatológico dos órgãos (pele, fígado, intestino, olho, baço, linfonodos, músculos estriados, sinóvia, mucosa nasal, etc.) (Solano-Gallego *et al.*, 2009).
- **Cultura *in vitro*:** permite a identificação de promastigotas viáveis através de agar sangue. Tem como principal desvantagem exigir um longo período de incubação (mais de 30 dias), mas é o único procedimento que permite isolar e manter a população com capacidade infetante (Gramiccia, 2011). Normalmente, este método é apenas usado em investigação (Solano-Gallego *et al.*, 2009).
- **Xenodiagnóstico:** consiste em permitir que flebótomos criados em laboratório se alimentem do cão suspeito que é previamente sedado e colocado numa jaula de contenção. Os insetos são examinados após a ingestão de sangue para a identificação de promastigotas no intestino. O método é bastante específico e sensível, permitindo ainda inferir da possibilidade de transmissão do parasita, apesar de não ser aplicável à prática clínica (Gramiccia, 2011).

2.5.4. Diagnóstico molecular: A PCR veio aumentar a sensibilidade no diagnóstico da Leishmaniose (Solano-Gallego *et al.*, 2009) estando, particularmente, indicada em animais sem lesões cutâneas (Simões, 2012). Com efeito, a deteção de ADN específico, tanto ADN genómico como ADN do cinetoplasto do parasita, permite um diagnóstico específico e sensível, sendo que os testes que utilizam ADN cinetoplastidial parecem ser mais sensíveis.

Para o diagnóstico, a PCR de medula óssea, linfonodos, baço ou pele mostra uma maior sensibilidade e especificidade. Adicionalmente, a detecção de ADN parasitário a partir da recolha não invasiva de células da conjuntiva com zaragatoa revelou-se, também, bastante sensível e específica (Solano-Gallego *et al.*, 2009). De salientar que a sensibilidade do protocolo da PCR está relacionada com o número de cópias iniciais da região a amplificar (Miró *et al.*, 2008).

Presentemente, existem três técnicas disponíveis baseadas na PCR: a PCR convencional, a *nested*-PCR e a PCR quantitativa em tempo real (Solano-Gallego *et al.*, 2009). A PCR convencional usa sequências de oligonucleótidos complementares ao ADN a amplificar (conhecidas como *primers*). A zona de ADN a amplificar é muito repetitiva e, geralmente, codifica uma pequena subunidade do ARNr ou minicírculos de ADN do cinetoplasto. É de salientar que a informação fornecida pela PCR deve ser vista em conjunto com os resultados obtidos pela avaliação serológica e clinicopatológica. A presença de ADN de *Leishmania* no sangue ou em outros tecidos apenas indica que o cão é portador de material genómico do parasita, podendo nunca vir a desenvolver a doença. Desta forma, compreende-se que a interpretação dos resultados da PCR, em animais assintomáticos, deve ser realizada com cautela tendo em atenção a finalidade do diagnóstico. Por exemplo, quando o objetivo é identificar cães infetados e impedir que estes sejam exportados para países não endémicos ou evitar a transmissão da infeção por produtos sanguíneos, a PCR é uma técnica excelente. Pelo contrário, a decisão de implementar uma terapêutica anti-Leishmaniose não deve ser baseada unicamente num resultado positivo da PCR (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Para aumentar a sensibilidade do diagnóstico, pode ser realizado uma *nested* PCR ou uma *semi-nested* PCR utilizando pares de *primers* internos complementares às sequências já mencionadas. A técnica de PCR em tempo real é mais sensível que a PCR convencional, estando indicada para o estudo da cinética da infeção e monitorização da resposta à terapêutica (Gramiccia, 2011) uma vez que permite detetar cargas parasitárias extremamente baixas quando comparada com a PCR convencional (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

2.5.5. Diagnóstico serológico: No Cão, a seroconversão pode ocorrer entre o primeiro e o vigésimo segundo mês após a infeção (Gramiccia, 2011). De salientar que apenas os cães parasitados mostram um aumento progressivo do título de anticorpos ao longo do tempo. Desta forma, um título elevado de anticorpos constitui um diagnóstico definitivo porque está associado a uma grande carga parasitária. Se os títulos forem baixos em animais com lesões cutâneas, está indicada a realização do exame histológico, imunohistoquímico ou a PCR e, caso os resultados sejam positivos, são indicativos de infeção (Simões, 2012).

Existem inúmeras técnicas serológicas disponíveis algumas mais precisas, como o *western blot*, mas de uso mais limitado devido à sua fraca padronização ou por serem técnicas laboriosas. Os métodos serológicos comumente usados são: o IFAT (*Indirect Fluorescent Antibody Test*), o ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) – testes serológicos quantitativos – e os testes rápidos de imunocromatografia (Gramiccia, 2011).

O IFAT tem sensibilidade e especificidade elevada, sendo considerado pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) como o método de referência. A titulação de anticorpos circulantes através do IFAT permite distinguir casos subclínicos (títulos baixos) de casos clínicos (Gramiccia, 2011) sendo, no entanto, menos sensível em infecções assintomáticas (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Atualmente, não existe um consenso entre os diferentes laboratórios relativamente ao título de anticorpos que já significa doença, podendo este variar entre 1:40 e 1:320. Os casos falsos-positivos podem surgir devido à reação cruzada com anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi*, particularmente, em áreas onde ambas as parasitoses são endêmicas como é o caso da América Latina e do sul dos Estados Unidos (Gramiccia, 2011). Para ultrapassar esta limitação, foram purificados polipéptidos recombinantes com epitopos únicos de *Leishmania* como, por exemplo, os péptidos recombinantes: K39 (rK39) (Miró *et al.*, 2008), rA2, rK9 ou rK26 (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

A sensibilidade e a especificidade do ELISA é média-alta dependendo do antígeno empregue sendo, geralmente, usados extratos de promastigotas solubilizados e proteínas recombinantes purificadas, aumentando a sua sensibilidade porque múltiplos antígenos são usados (Solano-Gallego *et al.*, 2009; Gramiccia, 2011). O ELISA com péptidos recombinantes é bastante específico, apresentando uma menor sensibilidade na deteção de animais infetados e assintomáticos (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

Estão disponíveis vários *kits* comerciais para diagnóstico através de imunocromatografia rápida, que podem ser distinguidos entre si de acordo com o antígeno e os reagentes usados. A sua utilização é simples e atrativa para o clínico, porém a exatidão no diagnóstico é menor que os métodos quantitativos. Têm boa especificidade mas a sua sensibilidade é variável (Solano-Gallego *et al.*, 2009), ocorrendo com alguma frequência falsos-negativos; quando a suspeita clínica se mantém devido a resultados duvidosos, a serologia deve ser o método selecionado (Gramiccia, 2011).

O diagnóstico precoce permite aos médicos veterinários realizarem um controlo satisfatório da doença, atuando antes do animal desenvolver as complicações secundárias à Leishmaniose. No entanto, muitas vezes é necessário mais do que um teste para se poder chegar a uma conclusão fiável (Pinto, 2012). No caso de animais assintomáticos, a investigação da doença

deve ser conduzida de forma diferente porque são, frequentemente, seronegativos e a baixa carga parasitária que transportam pode não ser detetada por PCR (limiar de detecção de 2 a 5 parasitas por mililitro de sangue). Assim, é recomendável que seja realizada PCR de kADN a partir de linfonodo, medula óssea ou baço e, em paralelo, uma pesquisa de anticorpos por serologia quantitativa. A confirmação da negatividade de infecção pode implicar a repetição dos testes após 3 meses (Miró *et al.*, 2008). Adicionalmente, os animais assintomáticos devem ser testados para anticorpos anti-leishmania, caso tenham uma viagem programada, sejam dadores de sangue ou caso os seus proprietários desejem monitorizá-los a cada 12 meses para uma detecção precoce da infecção (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

Em resumo, as técnicas mais expeditas para o diagnóstico de animais infetados são: a detecção de anticorpos específicos anti-leishmania por diversas técnicas serológicas ou a demonstração do ADN parasitário em tecidos através de metodologias moleculares (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Alguns animais podem manter-se seronegativos por períodos de tempo variáveis após a infecção, podendo a avaliação serológica falhar. Contudo, graças ao período de incubação relativamente longo, os animais infetados produzem anticorpos antes de desenvolverem sintomatologia (Simões, 2012).

Na **Leishmaniose felina**, o diagnóstico é realizado por métodos diretos como o exame citológico por biópsia, cultura *in vitro* e testes moleculares. O diagnóstico histológico pode ser usado nos casos que apresentem lesões dermatológicas e oftalmológicas. O diagnóstico serológico normalmente confirma o diagnóstico direto mas não está tão padronizado como no Cão. A Leishmaniose deve ser despistada em gatos que apresentem os seguintes sinais clínicos: aumento dos linfonodos, uveíte, dermatite esfoliativa/ulcerativa ou nodular, hiperproteinémia e hipergamaglobulinémia. Em geral, animais que apresentem estes sinais requerem tratamento específico e monitorização (Gramiccia, 2011).

2.6. Terapêutica

O complexo ciclo de vida do parasita apresenta várias janelas de oportunidade que podem ser exploradas para o desenvolvimento de novos fármacos.

Durante várias décadas, os únicos fármacos recomendados para o tratamento da Leishmaniose foram os compostos antimoniais, inicialmente, na sua forma trivalente que, depois, foi substituída devido à sua elevada toxicidade, pela forma pentavalente – o antimoniato de meglumina e o estibogluconato de sódio. Os antimoniais apresentam uma eficácia variável e necessitam de ser injetados por via subcutânea, intramuscular ou endovenosa. Atualmente, procura-se reduzir a toxicidade dos antimoniais e melhorar a sua distribuição utilizando, por exemplo, formulações liposômicas. Os antimoniais têm um largo espectro de ação; estas moléculas após entrarem na célula hospedeira atravessam a membrana do fagolisossoma, onde são convertidas em antimoniais trivalentes, comprometendo o potencial redox dos amastigotas, induzindo o efluxo de tióis e, consequentemente, inibindo a tripanotiona redutase (Freitas-Junior *et al.*, 2012). Durante o tratamento, alguns cães podem apresentar vômitos, diarreia, dor abdominal, mialgia e apatia em concomitância com alterações renais, hepáticas e pancreáticas (Santos-Gomes & Pereira da Fonseca, 2008).

A miltefosina (hexadecilfosfocolina) pertence à família dos alquilfosfolípidos, análogos estáveis da lisofosfatidilcolina (Farca *et al.*, 2012). Foi inicialmente usada como uma molécula anti-tumoral e só depois foi aplicada no tratamento da Leishmaniose. É um fármaco anti-parasitário relativamente recente e foi o primeiro tratamento *per os* a apresentar resultados no combate à Leishmaniose visceral, sendo a primeira linha de tratamento em crianças (Farca *et al.*, 2012), onde tem mostrado uma taxa de cura de 98% (Roberts & Janovy, 2009). A miltefosina possui uma estrutura semelhante aos compostos fosfolipídicos que são metabolizados pelos protozoários atuando seletivamente no metabolismo do parasita. Desta forma, a miltefosina penetra na membrana celular e acumula-se rapidamente no parasita obrigando a metabolização rápida e intensa dos ésteres. Adicionalmente, interfere com as vias de sinalização parasitárias e com as vias de síntese das membranas ao inibir a síntese dos recetores de GPI (glicosilfosfatidilinositol), uma molécula essencial à sobrevivência das formas amastigotas. Atua, igualmente, sobre a fosfolipase C e a proteína cinase C de *Leishmania* pervertendo o sinal de transdução que medeiam, induzindo a apoptose parasitária (Bianciardi, 2011). A miltefosina mostra ainda um efeito imunomodulador no hospedeiro, por estimulação da produção de iNOS que catalisa a produção de óxido nítrico (Freitas-Junior *et al.*, 2012). O fármaco pode ser administrado isoladamente ou em combinação com o alopurinol, sendo que neste último caso, a eficácia é melhorada. No entanto, tal como os outros fármacos disponíveis não elimina, totalmente, o parasita (Farca *et al.*, 2012). Os efeitos

secundários são dependentes da dose, sendo os vômitos e a diarreia os mais frequentes. Estes ocorrem nos primeiros 5 a 10 dias de tratamento, sob a forma de episódios que podem durar 1 a 2 dias e a sua administração concomitante com alimentos reduz os efeitos secundários. Em relação à função renal, a miltefosina parece ter um impacto reduzido, não devendo ser usada durante a gestação devido aos seus efeitos embriotóxicos, fetotóxicos e teratogênicos (Bianciardi, 2001).

A anfotericina B é um antibiótico e um anti-fúngico de uso sistêmico. É usado como alternativa nos casos de Leishmaniose visceral resistentes aos antimoniais. Contudo, devido à sua toxicidade, a sua prescrição deve ser fundamentada e a administração lenta por via endovenosa. Apresenta outras desvantagens para além da via de administração, como a nefrotoxicidade, que se soma às lesões renais provocadas pelo parasita (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Esta molécula liga-se aos esteróis da membrana (como o ergosterol) formando poros que alteram o balanço iónico e conduzem à morte celular parasitária. Novas formulações lipídicas de anfotericina foram desenvolvidas de forma a melhorar a sua biodisponibilidade e farmacocinética reduzindo, simultaneamente, os seus efeitos secundários. Em modelos experimentais estas formulações sofrem acumulação hepática, alcançando doses terapêuticas mais rapidamente que os antimoniais e apresentam um tempo de semi-vida maior (Freitas-Junior *et al.*, 2012).

A paromomicina é um antibiótico aminoglicosídeo com atividade anti-leishmania. É usado topicamente no tratamento da Leishmaniose cutânea humana e como injetável endovenoso no tratamento da Leishmaniose visceral. Este fármaco reduz o potencial de membrana da mitocôndria, inibindo a síntese proteica e conduzindo à interrupção da fosforilação oxidativa mitocondrial. Paralelamente, altera a fluidez da membrana e o metabolismo lipídico do parasita (Freitas-Junior *et al.*, 2012). Pode ser administrada em associação com os antimoniais de forma a potenciar a sua permanência em circulação (Santos-Gomes & Pereira da Fonseca, 2008). Apresenta vários efeitos secundários graves – nefrotoxicidade e ototoxicidade – não sendo recomendado como fármaco de primeira linha (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

A pentamidina é uma diamidina que foi usada como fármaco de segunda linha na terapia de Leishmaniose visceral humana resistente aos antimoniais. A sua elevada toxicidade, combinada com o decréscimo da sua eficácia, conduziu ao seu abandono na Índia, continuando disponível para terapias combinadas. Este fármaco parece afetar de alguma forma a mitocôndria já que é neste organelo que se concentra (Freitas-Junior *et al.*, 2012).

A sitamaquina é o segundo fármaco de administração oral para o tratamento da Leishmaniose, em desenvolvimento, após a miltefosina. Um estudo recente mostrou que o seu alvo é a

enzima succinato desidrogenase que, quando inibida, provoca stress oxidativo em promastigotas de *L. donovani* (Freitas-Junior *et al.*, 2012).

O alopurinol é um análogo estrutural da hipoxantina que é metabolizado num isômero inativo da inosina pelo protozoário *Leishmania*. Ao ser incorporado no ARN do parasita reduz a taxa de tradução conduzindo à sua morte. Quando administrado isoladamente por um período mínimo de 2 a 3 meses, o alopurinol leva a melhoras clínicas assinaláveis, bem como à normalização de alguns parâmetros laboratoriais (proteínas inflamatórias da fase aguda). Tal como os antimoniais, o alopurinol também não elimina totalmente o parasita e as recidivas ocorrem sempre que o tratamento é interrompido. Desta forma, o alopurinol é administrado durante vários meses, sendo muito bem tolerado pelo organismo (Farca *et al.*, 2012).

Até ao momento, o antimoniato de meglumina, a miltefosina, a aminosidina e o alopurinol são os únicos fármacos licenciados na Europa para o tratamento da Leishmaniose. A combinação do antimoniato de meglumina com o alopurinol é considerada a terapêutica mais eficaz, constituindo o protocolo de primeira linha (Solano-Gallego *et al.*, 2009) apesar de não permitir a eliminação completa do parasita (Farca *et al.*, 2012). O risco de toxicidade renal está aumentado em animais que apresentem insuficiência renal, existindo como alternativa ao protocolo que associa o antimoniato de meglumina ao alopurinol, o tratamento que conjuga a miltefosina com o alopurinol (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

Todos estes tratamentos diminuem o nível de infeção parasitária, mas não a debelam totalmente, mantendo-se o potencial contaminante do animal. A duração do protocolo terapêutico e a resposta esperada está dependente do estadio da doença, sendo que nos cães com insuficiência renal espera-se uma recuperação menor. Por outro lado, a maioria dos cães apresenta algumas melhoras clínicas ao final do primeiro mês de tratamento, apesar do título dos anticorpos e das concentrações das proteínas séricas requererem mais tempo para normalizarem. Alguns animais manifestam efeitos secundários à terapêutica que não devem ser confundidos com uma deterioração do estado clínico. Os parâmetros que devem ser monitorizados durante o tratamento dependem do paciente. No entanto, é recomendada a realização do hemograma completo, do perfil bioquímico e da urianálise onde se inclua, no caso de cães com proteinúria, a razão proteína urinária/creatinina (UPC). A frequência de monitorização também varia de caso para caso mas, na maioria das situações, os parâmetros clinicopatológicos devem ser avaliados mais frequentemente no início do tratamento (primeiro mês) e depois de 4 em 4 meses. Mais tarde e caso o animal recupere na totalidade, recomenda-se a monitorização a cada 6 - 12 meses (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

Em resumo, todos os fármacos disponíveis têm limitações *per si* e vários estudos têm demonstrado benefícios pela sua combinação, levando a WHO (2010) a encorajar à adoção de políticas de combinação terapêutica. Contudo, a necessidade de administração parental, a sua elevada toxicidade e o surgimento de resistências tem precipitado a premente necessidade de novas moléculas para o tratamento da Leishmaniose.

2.7. Profilaxia

A prevenção da picada pelos flebótomos bloqueia o ciclo de vida de *Leishmania*, evitando que a infeção se instale no hospedeiro vertebrado. Diversos compostos têm mostrado efeito repelente e/ou inseticida com graus diferentes de eficácia que depende: do modo de ação, da capacidade de dispersão, do tempo de manutenção na pele e da suscetibilidade do flebótomo (Miró *et al.*, 2008). Entre os vários produtos disponíveis, os piretróides são os mais usados por combinarem a sua eficácia aos reduzidos efeitos tóxicos no Cão. Existem numerosos produtos comerciais desde as coleiras de libertação lenta, aplicações *spot-on* e formulações em *spray*. As coleiras impregnadas com deltametrina apresentam um efeito repelente que pode durar até 6 meses, 1 a 2 semanas após a aplicação. Estas coleiras são eficazes contra várias espécies de flebótomos na Europa, Ásia e América do Sul (Miró *et al.*, 2008; Solano-Gallego *et al.*, 2009). As formulações em *spray* ou em *spot-on* também conferem uma boa proteção apesar de menor duração (2 a 5 semanas). A aplicação *spot-on* de permetrina oferece uma boa proteção inseticida contra o *P. perniciosus*, 24 a 48h após a aplicação e durante pelo menos 21 dias. Estes produtos tópicos levam alguns dias para se distribuírem por toda a superfície corporal, no entanto, as formulações em pó têm um efeito imediato embora de menor duração. O imidaclopride (inseticida nicotinóide) potencia as propriedades dos piretróides como a permetrina, conseguindo-se um forte e imediato efeito repelente contra *P. papatasi* e *P. perniciosus* que permanece por 3 a 4 semanas (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Assim, dependendo do tipo de formulação, o período de proteção é diferente e tal deverá ser tido em conta no planeamento do esquema de prevenção (Gramiccia, 2011). Os proprietários de animais devem ser aconselhados a ler o rótulo do produto para que a frequência e o modo das aplicações sejam feitas corretamente. É também fundamental educar os donos para a aplicação do inseticida durante toda a época de atividade do inseto (Solano-Gallego *et al.*, 2009; Gramiccia, 2011). Além dos inseticidas e dos repelentes, devem tomar-se as seguintes medidas para uma proteção integrada contra os flebótomos: manter os animais em casa entre o anoitecer e o amanhecer durante a época de transmissão, reduzir os microhabitats dos flebótomos próximos dos locais onde os cães permanecem (Solano-Gallego *et al.*, 2009),

aplicar *sprays* em casa, instalar protetores de janelas e de portas e colocar redes nos canis e cortinas com piretróides residuais (Miró *et al.*, 2008).

Todos os cães que vivam ou se desloquem para áreas endêmicas devem ser protegidos individualmente contra flebótomos para prevenir a infecção por *Leishmania* (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Portanto, para os animais que viagem de uma zona não endêmica para uma endêmica, as medidas a tomar devem ser as mesmas aplicadas aos animais que vivem numa área endêmica, devendo-se alertar os proprietários de que, dependendo do produto, o intervalo até à proteção total varia do imediato a 1 semana. É, no entanto, recomendável colocar a coleira 2 semanas antes da viagem e esta deve ser substituída a cada 6 meses. Em alternativa, formulações *spot-on* ou em *spray* devem ser aplicadas 2 dias antes da viagem e repetidas a cada 2 - 3 semanas, dependendo do produto. É de salientar que estas formulações exigem que os proprietários sejam colaborantes e se lembrem de repetir as aplicações, enquanto as coleiras de libertação lenta não necessitam de ser substituídas mais do que duas vezes ao ano, mesmo nas zonas onde o flebótomo está ativo todo o ano. Após o regresso, devem ser realizadas consultas de acompanhamento que incluam exames clínicos e laboratoriais (Solano-Gallego *et al.*, 2009; Gramiccia, 2011).

Os animais que estejam em tratamento continuam a ser potencialmente infecciosos para os insetos e, por isso, também devem ser protegidos da sua picada.

Idealmente, o controlo da Leishmaniose canina deve passar por uma abordagem integrada que inclua a vacinação para *L. infantum* e a aplicação de inseticidas. Enquanto os inseticidas tópicos previnem novas infeções e reduzem as picadas de insetos em animais já infetados, a vacina previne o estabelecimento da infecção numa situação que tenha escapado ao efeito do inseticida ou o desenvolvimento da doença (Gramiccia, 2011). De sublinhar que o adjuvante adicionado à vacina exerce um papel primordial no processamento antigénico e no seu reconhecimento pelo sistema imunitário, sendo a sua escolha de extrema importância. Em cães já foram avaliadas vacinas de promastigotas inativados e de fração purificada de *Leishmania* que inclui componentes do parasita obtido a partir de culturas. Uma vacina baseada nesta estratégia foi avaliada, em três estudos, no Brasil após 12, 24 e 48 meses. Tendo mostrado uma eficácia de 80% (Miró *et al.*, 2008) foi a primeira vacina a ser comercializada para a Leishmaniose canina no Brasil (Leishmune®). No entanto, a distinção entre os cães naturalmente infetados e os animais vacinados não é fácil, o que tem implicado alguma relutância no seu uso, no Brasil, país onde os cães infetados são abatidos (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Vacinas de antígenos recombinantes obtidas a partir de proteínas imunogénicas de *Leishmania* têm sido testadas sem resultados interessantes, sendo que as vacinas de ADN constituem uma alternativa cada vez mais promissora (Miró *et al.*, 2008).

Outras vacinas estão em fase experimental e, no ano de 2011, foi lançada a CaniLeish® na Europa, até à data, o único medicamento veterinário para a prevenção da Leishmaniose canina com autorização de venda nos 27 países da União Europeia. Todavia, deve frisar-se que, por não existirem estudos sobre o efeito da vacina em animais infetados ou doentes, esta vacina só deve ser aplicada a animais que nunca contactaram com o parasita. Os animais vacinados devem continuar a ser protegidos com inseticidas ou repelentes dos flebótomos (Pinto, 2012).

2.8. Resistências

Cortazár *et al.* (2007) relata que, em algumas zonas endémicas (por exemplo na Índia), os antimoniais pentavalentes foram considerados obsoletos devido ao surgimento de parasitas resistentes. Foi também relatada uma falha no tratamento da Leishmaniose humana com antimoniais na América do Sul. Na realidade, a ocorrência de resistências a antimoniais pentavalentes, anfotericina B, aminosidina e miltefosina está bem documentada na medicina humana. Em medicina veterinária esta informação é muito escassa (Romão *et al.*, 2007; Solano-Gallego *et al.*, 2009); foi descrita uma sensibilidade menor ao antimoniato de meglumina e aos antimoniais em isolados de *L. infantum*, após vários ciclos de tratamento. Todavia, não foram observadas diferenças na suscetibilidade a antimoniais em amostras de amastigotas de *L. infantum* obtidas a partir de cães não tratados e após várias passagens *in vitro* (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

2.9. Prognóstico

O tratamento quimioterápico baseado na associação do antimoniato de meglumina com o alopurinol ou na monoterapia com o alopurinol conduz frequentemente à cura clínica. No entanto, a cura é temporária e estes animais podem recidivar durante a terapêutica ou após a interrupção desta. Desta forma, a cura parasitária ocorre muito raramente, sendo que todos os animais tratados, mesmo os que foram medicados com um regime prolongado de alopurinol, continuam a transportar o parasita e são potencialmente infecciosos para os flebótomos (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

O prognóstico da Leishmaniose canina é difícil de estabelecer, atendendo à variedade dos quadros clínicos e dos fatores que condicionam a progressão da doença. As tabelas de estadiamento clínico permitem agrupar os animais de forma a prever a gravidade do quadro clínico e o prognóstico, sendo estes critérios úteis para avaliação da eficácia das diferentes terapêuticas, para decidir qual o protocolo mais adequado e ajuizar um prognóstico. Os critérios de classificação devem ser simples e recorrerem a métodos de diagnóstico rápidos e

fiáveis. Respeitando os critérios estabelecidos, cada paciente é classificado e, mais tarde, esse estadiamento poderá ser alterado consoante a evolução da doença (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Na tabela 1 descreve-se um sistema de classificação com quatro estadios clínicos baseados nos sinais, nas alterações clinicopatológicas, na serologia e no tipo de protocolo terapêutico seguido (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Cães com insuficiência renal têm uma taxa de recuperação inferior aos que mostram funcionamento renal normal ou ligeira proteinúria (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

Tabela 1: Estadiamento da Leishmaniose canina de acordo com a avaliação serológica, sinais clínicos, alterações laboratoriais, terapêutica e, respetivo, prognóstico (adaptado de Solano-Gallego *et al.*, 2009).

Estadios Clínicos	Serologia *	Sinais Clínicos	Provas Bioquímicas	Terapia	Prognóstico
Estadio I Doença Ligeira	Título baixo ou ausente de anticorpos	Alguns sinais clínicos como linfadenomegália periférica ou dermatite papular	Perfis pouco alterados: creatinina <1,4 mg/dl; não proteinúrico: UPC <0,5	Não aconselhada/ Alopurinol ou antimoniato de meglumina ou miltefosina/ Alopurinol e antimoniato de meglumina ou miltefosina **	Bom
Estadio II Doença Moderada	Título baixo a alto de anticorpos	Além dos sinais do estadio I podem ocorrer: lesões cutâneas difusas e simétricas como a dermatite esfoliativa, onicogribose e ulcerações (nariz, almofadinhas plantares, proeminências ósseas, junções mucocutâneas)	Pode ser observada: ligeira anemia não regenerativa, hiperglobulinemia, hipoalbuminemia ou síndrome de hiperviscosidade sérica. Subestadios: a) perfil renal normal: creatinina <1,4 mg/dl; não-proteinúrico: UPC < 0,5 b) creatinina <1,4 mg/dl; UPC = 0,5-1	Alopurinol e antimoniato de meglumina ou miltefosina	Bom a reservado
Estadio III Doença Grave	Título médio a alto de anticorpos	Além dos sinais descritos nos estadios I e II, podem ocorrer sinais clínicos resultantes da deposição de imunocomplexos: vasculite, artrite, uveíte e glomerulonefrite	Alterações observadas no estadio II de Doença Renal Crónica (DRC): estadio I com UPC>1 ou estadio II com creatinina 1,4-2 mg/dl	Alopurinol e antimoniato de meglumina ou miltefosina Seguir recomendações para o tratamento da DRC	Reservado a muito reservado
Estadio IV Doença Muito Grave	Título médio a alto de anticorpos	Além dos sinais clínicos apresentados no estadio III pode também surgir tromboembolismo pulmonar ou síndrome nefrótica e doença renal em fase terminal	Alterações observadas no estadio II da DRC, estadio III (creatinina 2-5 mg/dl) e estadio IV (creatinina >5mg/dl). Síndrome nefrótica: proteinúria marcada UPC>5	Alopurinol Seguir recomendações para o tratamento da DRC	Muito reservado

*Animais que apresentem um título nulo ou baixo de anticorpos devem ser retestados por outras técnicas de diagnóstico como a citologia, histologia, imunohistoquímica ou PCR. Títulos elevados de anticorpos (3 a 4 vezes acima do limite superior de referência do laboratório) são considerados conclusivos para o diagnóstico da Leishmaniose.

** Cães no estadio I requerem um tratamento curto com uma combinação de dois fármacos ou, em alternativa, monitorização da doença sem qualquer terapêutica associada.

2.10. Saúde Pública

A Leishmaniose visceral humana é uma doença zoonótica causada por *L. infantum*. Potencialmente fatal afeta, principalmente, crianças, idosos e adultos infetados com VIH. A transmissão da doença a partir de cães e de animais selvagens não é negligenciável na infeção humana e condições socioeconómicas frágeis têm um efeito amplificador. No entanto, a posse de animais infetados não é vista como estando associada a um maior risco de infeção humana no sul da Europa, apesar de estudos realizados na Grécia e em Espanha indicarem uma correlação positiva entre a infeção humana e a canina. O futuro controlo da Leishmaniose passa por uma prevenção integrada da espécie reservatório que deverá incluir a vacinação contra *L. infantum* e o uso de coleiras com deltametrina ou outros inseticidas de longa duração.

Adicionalmente, os sistemas de monitorização integrados e interdisciplinares devem ser mantidos para que os dados epidemiológicos sobre a doença sejam transmitidos de uma forma rápida e padronizada aos profissionais de saúde animal e humana (Miró *et al.*, 2008). A implementação de redes epidemiológicas nacionais e internacionais tem permitido divulgar e alertar as autoridades sanitárias sobre a evolução da doença, sendo possível uma redução da prevalência e de incidência da Leishmaniose canina e humana (Campino & Maia, 2010). A nível nacional, o ONLeish tem como objetivo uma colaboração articulada entre os Centros de Atendimento Médico Veterinário e os laboratórios de diagnóstico através da rede de vigilância epidemiológica da Leishmaniose canina europeia (LEISHnet), de forma a obter uma imagem real da prevalência da doença, no país e na Europa. É também importante que sejam realizados rastreios epidemiológicos de âmbito nacional com intervalos regulares de 2 - 3 anos (Pinto, 2012).

3. Fármacos Inibidores Irreversíveis de Topoisomerases – Fluoroquinolonas

Os fármacos atualmente utilizados no tratamento da Leishmaniose são moléculas que melhoram o quadro clínico, mas que raramente evitam a recidiva por não eliminarem por completo o parasita (Farca *et al.*, 2012). O antimoniato de meglumina é a molécula que tem sido mais usada e talvez, por isso, a dosagem tem vindo a ser aumentada (Rougier, Hasseine, Delaunay, Michel & Marty, 2012). As recidivas são frequentes após o uso de antimoniato, mas a sua associação com o alopurinol tende a aumentar o intervalo de tempo entre os episódios clínicos. Todavia, este tratamento é oneroso e deve ser aplicado durante períodos longos por via endovenosa, subcutânea ou intramuscular, o que fomenta muito a negligência na sua posologia (Rougier, Vouldoukis, Fournel, Pérès & Woehrlé, 2008). Nas últimas décadas, poucos novos fármacos ou formulações foram disponibilizados apesar da toxicidade, indução de resistências, custos elevados e tratamentos prolongados associados aos fármacos atualmente disponíveis. De facto, uma vez que a sensibilidade aos antimoniais está a diminuir e as recidivas são cada vez mais frequentes, será necessário explorar novas alternativas terapêuticas com menor potencial deletério, de preferência formulações orais e com posologias curtas (Rougier *et al.*, 2008).

Recentemente, as fluoroquinolonas têm sido apontadas como potenciais agentes quimioterapêuticos em infeções parasitárias. Esta família de antibióticos tem um efeito imunomodulador por atenuar a expressão de citocinas, o que pode ser benéfico no tratamento da Leishmaniose, uma vez que a resposta imunológica do hospedeiro determina o desfecho da infeção (Rougier *et al.*, 2008). As fluoroquinolonas são moléculas bactericidas que apresentam bom poder de penetração nos tecidos e nas células dos mamíferos (Appelbaum & Hunter, 2000). Mostram uma atividade moderada a boa contra *Chlamydia*, micobactérias, micoplasmas e rickettsias sem interferirem com os enterococos comensais (Lees & AliAbadi, 2002). Estes antibióticos atuam inibindo a ação das topoisomerases bacterianas de tipo II sem inibirem as enzimas homólogas das células hospedeiras. Vouldoukis *et al.* (2006) afirmou que as topoisomerases de *Leishmania* podem vir a ser um bom alvo para estes fármacos atendendo à homologia da sua sequência com as enzimas bacterianas. Deste modo, as fluoroquinolonas podem vir a tornar-se compostos eficazes e uma alternativa interessante no tratamento da Leishmaniose, comparativamente aos agentes quimioterapêuticos atualmente disponíveis no mercado (Vouldoukis *et al.*, 2006; Farca *et al.*, 2012). As modificações moleculares realizadas nesta classe de fármacos, ao longo dos anos, têm vindo a melhorar a sua lipossolubilidade, potência e farmacocinética, sendo a sua atividade antimicrobiana ligeiramente dependente do pH (Lees & AliAbadi, 2002).

3.1. Estrutura e espectro de ação

As quinolonas (também conhecidas por 4-quinolonas) e as fluoroquinolonas constituem um grupo de fármacos antimicrobianos sintéticos com atividade dependente da concentração. A sua base química é um anel 4-quinolona (figura 7) que tem vindo a ser modificado de forma a otimizar as suas propriedades físico-químicas, dividindo-se os compostos sintetizados em quatro gerações (Martinez, McDermott & Walker, 2006). O ácido nalidíxico foi o primeiro destes compostos, sintetizado durante a produção da cloroquina, um composto anti-malárico. O espectro antibacteriano do ácido nalidíxico está limitado às enterobactérias Gram-negativas e, devido às suas limitações na absorção e na distribuição, apenas foi usado em infeções do trato urinário. Além disso, eram frequentes as resistências bacterianas a este fármaco (Martinez *et al.*, 2006).

Nos anos 80, a adição de um átomo de flúor à posição 6 do anel (fluoroquinolonas) e a ligação de uma piperazina à posição 7 estenderam o espectro de ação a *Pseudomonas aeruginosa* (aeróbia Gram-negativa) e a algumas bactérias Gram-positivas, melhorou a absorção oral e a distribuição tecidual (Martinez *et al.*, 2006). As primeiras fluoroquinolonas não foram logo usadas em clínica de forma a melhor compreender a relação entre a sua estrutura e a função, tendo possibilitado o desenvolvimento de compostos melhorados em termos de espectro de atividade e de farmacocinética, permitindo uma administração diária única (Lees & AliAbadi, 2002; Emmerson & Jones, 2003).

Hoje em dia são conhecidas várias modificações na estrutura química da molécula (figura 7) que provocam alterações na sua atividade, na farmacocinética, nas interações com outros fármacos e nos efeitos adversos. Estas modificações são, normalmente, múltiplas e as suas propriedades nem sempre são previsíveis (Appelbaum & Hunter, 2000).

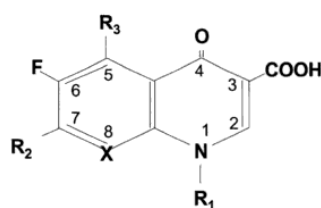


Figura 7: Estrutura base das fluoroquinolonas (Papich & Riviere, 2001).

Modificações químicas na posição 1 (átomo de azoto) afetam marcadamente a potência da molécula. Os primeiros compostos como o ácido nalidíxico, o ácido pipemídico, a norfloxacin e a enrofloxacin tinham na posição 1 um grupo etilo. Quando este foi substituído por um grupo químico de maior dimensão, a atividade contra as bactérias Gram-negativas e Gram-positivas foi potenciada. O grupo ciclopropil confere uma boa atividade

contra bactérias Gram-negativas e tem sido amplamente usado. Atualmente, a maioria dos compostos desenvolvidos ou, em desenvolvimento, contém esta cadeia lateral (ciprofloxacina, grepafloxacina, esparfloxacina, clinafloxacina, moxifloxacina, gatilfloxacina e gemifloxacina). A sitafloxacina apresenta nesta posição um grupo ciclopropil fluorado. Um anel entre as posições 1 e 8 foi introduzido pela primeira vez na flumequina (com fraca atividade bacteriana) e, posteriormante, foi mantido na ofloxacina, na levofloxacina (L-isómero) e na rufloxacina com aumento da atividade antibacteriana (Appelbaum & Hunter, 2000).

A parte da molécula que raramente é sujeita a alterações é a posição 2 (hidrogénio), 3 (ácido carboxílico) e 4 (oxigénio), pois pensa-se que são estas posições da molécula que se ligam à ADN girase bacteriana e, por isso, não será conveniente interferir na estereoquímica desta região (Appelbaum & Hunter, 2000).

As substituições na posição 5 parecem afetar a atividade contra Gram-positivos. Contudo, esta parece estar muito dependente de substituições noutras posições. Quase todas as fluoroquinolonas atualmente em uso – ciprofloxacina, clinafloxacina, gemifloxacina, gatilfloxacina, levofloxacina, ofloxacina, sitafloxacina e trovafloxacina – assim como os primeiros compostos sintetizados, têm apenas um átomo de hidrogénio nesta posição. Modificações que envolvam a introdução de um grande grupo químico nesta posição reduzem marcadamente a atividade, provavelmente, por interferirem com a região de ligação das posições 3 e 4. A atividade para Gram-positivas foi melhorada na grepafloxacina pela adição de um grupo metilo na posição 5 e, na esparfloxacina, pela adição de um grupo amina na mesma posição (Appelbaum & Hunter, 2000).

Na posição 6, a ligação de um átomo de flúor ao anel 4-quinolona aumenta substancialmente o espetro de atividade, a biodisponibilidade e a penetração tecidular da molécula. Atualmente, todas as 4-quinolonas comercializadas são halogenadas na posição 6 e algumas também o são na posição 8. A flumequina foi o primeiro composto com um átomo de flúor na posição 6. No caso da difloxacina existem dois átomos de flúor, mas esta dupla substituição não significa um aumento de potência relativamente aos compostos apenas com um átomo de flúor. A adição do segundo átomo de flúor à posição 8 aumenta a biodisponibilidade oral da difloxacina e o seu tempo de semi-vida. Contudo, esta alteração também amplifica a fototoxicidade do antibiótico (Martinez *et al.*, 2006).

Nas substituições da posição 7 podem ser apreciadas as maiores mudanças em termos de potência da atividade antibacteriana. Sabe-se que a adição de anéis heterocíclicos que contenham nitrogénio melhoram a atividade e a farmacocinética destes compostos. A primeira evidência surgiu com o uso de um anel de piperazina; a norfloxacina, a enoxacina e a

ciprofloxacina mantêm o anel de piperazina, apresentando uma boa atividade contra as bactérias Gram-negativas. A grepafloxacina, a lomefloxacina e a fleroxacina têm um grupo 3-metil piperazina, enquanto a ofloxacina e a levofloxacina mostram um grupo 4-metil piperazina e a esparfloxacina um grupo 3,5-dimetil-piperazina. Estas últimas moléculas têm uma excelente capacidade de penetração na célula bacteriana (Appelbaum & Hunter, 2000), uma boa atividade contra organismos Gram-negativos e algum grau de ação contra os Gram-positivos (Martinez *et al.*, 2006). A norfloxacina foi o primeiro composto a combinar um anel de piperazina na posição 7 com um átomo de flúor na posição 6. Apesar do anel de piperazina ter aumentado a ação contra *Pseudomonas aeruginosa* e cocos Gram-positivos, a fraca biodisponibilidade destes compostos manteve-se. Modificações químicas subsequentes conduziram ao aumento significativo da biodisponibilidade oral e ao alargamento do espectro de ação antimicrobiano (Martinez *et al.*, 2006); por exemplo, um grupo amino-pirrolidina favorece a atividade contra os Gram-positivos, enquanto o anel de pirrolidina sem o grupo amino é prejudicial para a atividade antimicrobiana. Tanto a tosufloxacina como a clinafloxacina têm um radical 3-amino-pirrolidina e a sitafloxacina tem um grupo 3-amino-4-ciclohexil que lhes conferem uma excelente atividade contra as bactérias Gram-positivas (Appelbaum & Hunter, 2000).

Substituições químicas na posição 8 afetam as propriedades *in vivo* e a atividade antibacteriana, particularmente, em bactérias anaeróbias. Os radicais mais favoráveis em termos de atividade antibacteriana são os halogénios – cloro ou flúor – contudo algumas moléculas mostram propriedades fototóxicas. Como exemplos destas substituições temos a clinafloxacina e a sitafloxacina que apresentam um átomo de cloro na posição 8 e a esparfloxacina, a fleroxacina e a lomefloxacina que possuem um átomo de flúor. O radical metoxilo confere uma boa atividade contra anaeróbios sem aumentar a fototoxicidade, ao contrário daquilo que acontece na moxifloxacina e na gatifloxacina. Outros antibióticos têm na posição 8 apenas o átomo de hidrogénio como são exemplo: a norfloxacina, a pefloxacina, a ciprofloxacina e a grepafloxacina (Appelbaum & Hunter, 2000).

Consoante estas e outras modificações estruturais as quinolonas são classificadas em quatro gerações, apesar dos critérios não estarem totalmente definidos. A primeira geração compreende o ácido nalidíxico, o ácido oxonílico, o ácido pipemídico, a cinoxacina e a flumequina. Estas moléculas têm fraca biodisponibilidade, distribuição tecidual limitada e um espectro de atividade limitado à *Escherichia coli* e a outros microrganismos Gram-negativos (Górniak, 2006; Martinez *et al.*, 2006). Nas moléculas de segunda geração, o espectro de atividade aumenta e, para além, da atividade contra enterobactérias aumentar, passaram a atuar contra outras bactérias Gram-negativas como *P. aeruginosa*. A sua absorção

oral e distribuição sistêmica foi melhorada, fazendo parte desta geração vários compostos estruturalmente diferentes e com espectros distintos: enrofloxacin (de uso veterinário exclusivo), ciprofloxacin, enoxacin, fleroxacin, lomefloxacin, difloxacin (de uso veterinário exclusivo), norfloxacin, ofloxacin e pefloxacin. A terceira geração mostra atividade contra os microrganismos sensíveis às fluoroquinolonas de segunda geração, mas o seu espectro de ação aumenta para alguns microrganismos Gram-positivos (Pallo-Zimmerman, Byron & Graves, 2010), cobrindo também infecções por *Streptococcus pneumoniae* (Emmerson & Jones, 2003). Estes compostos (levofloxacin, balofloxacin, grepafloxacin, danofloxacin e marbofloxacin – ambos de uso veterinário exclusivo – e esparfloxacin) caracterizam-se por uma maior atividade contra bactérias Gram-positivas e agentes patogênicos eucariotas intracelulares, possuindo também alguma atividade contra anaeróbios (Emmerson & Jones, 2003). A quarta geração de fluoroquinolonas foi criada através de modificações simples nas posições 7 e 8, na enrofloxacin. Estes compostos conservam a sua ação contra Gram-negativos, apresentando uma maior atividade contra os Gram-positivos e os anaeróbios (Pallo-Zimmerman *et al.*, 2010). Recentemente, os membros desta última geração de fluoroquinolonas mostraram beneficiar da ligação do radical -OCH₃ à posição 8 (Al-Trawneh *et al.*, 2010) que lhes aumentou a atividade contra bactérias Gram-positivas e anaeróbias. Neste grupo de moléculas incluem-se a besifloxacin, a clinafloxacin, a garenoxacin, a trovafloxacin e a moxifloxacin. Devido ao aumento gradual do espectro de ação destas moléculas, os fármacos de primeira geração foram caindo em desuso (Górniak, 2006; Martinez *et al.*, 2006).

Ao longo dos anos, a indústria farmacêutica sintetizou um elevado número de derivados a partir da estrutura química 4-quinolona, nos quais parece haver uma relação inversa entre a atividade contra microrganismos Gram-negativos e Gram-positivos. Outra limitação às substituições é o aumento da toxicidade para o hospedeiro. Algumas mudanças estruturais testadas conduziram a alterações das propriedades de farmacocinética, de tolerabilidade, do espectro de ação antibacteriana e das interações entre fármacos (Martinez *et al.*, 2006).

In vivo, as fluoroquinolonas sofrem quelação por cátions divalentes e, por isso, não devem ser administradas por via oral com antiácidos ou sucralfato. No entanto, este fenómeno de quelação não se verifica em administrações parenterais, pelo que estes medicamentos podem ser administrados com fluidos cristaloides (por exemplo cloreto de sódio 0,9% e solução de lactato de Ringer). Em animais que estejam a receber teofilina, o uso de fluoroquinolonas deve ser monitorizado por poder ocorrer numa intoxicação secundária (Pallo-Zimmerman *et al.*, 2010).

3.1.1. Ácido nalidíxico – primeira geração

A estrutura do ácido nalidíxico (figura 8) afasta-se bastante das várias características associadas às 4-quinolonas mais recentes. Por exemplo, contém dois átomos de nitrogénio no núcleo estrutural, o que o torna um naftiridino não halogenado. Apresenta fraca biodisponibilidade, baixa absorção oral, uma concentração mínima inibitória (CMI) alta e um espectro de ação limitado apenas a alguns microrganismos Gram-negativos (Martinez *et al.*, 2006).

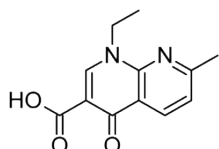


Figura 8: Estrutura molecular do ácido nalidíxico (Fonte: Wikipédia, http://en.wikipedia.org/wiki/Nalidixic_acid).

3.1.2. Ciprofloxacina – segunda geração

A ciprofloxacina (figura 9) foi um dos primeiros compostos a mostrar atividade bactericida em bacilos Gram-negativos, apesar do reduzido interesse em microrganismos Gram-positivos (Zhanel & Noreddin, 2001). A posição 1 é ocupada por um grupo ciclopropil como na enrofloxacin (Martinez *et al.*, 2006). Na realidade, a ciprofloxacina é um metabolito da enrofloxacin, sendo o espectro de atividade destes fármacos muito idêntico. A ciprofloxacina é bem absorvida por via oral, mas a biodisponibilidade é de apenas 40% em relação à da enrofloxacin nos cães e de 33% nos gatos (Pallo-Zimmerman *et al.*, 2010). Desconhece-se a razão deste fenómeno mas pensa-se que o metabolismo das células do epitélio intestinal possa ser o responsável por este comportamento diferencial. Contudo, o efeito de primeira passagem também pode ser importante, uma vez que a ciprofloxacina é parcialmente metabolizada no fígado. Apesar da sua fraca biodisponibilidade oral, são alcançadas boas concentrações a nível sérico e tecidular. Nos humanos, a ciprofloxacina mostra uma ligação às proteínas plasmáticas de 20 a 40%, concentrando-se na urina, secreção prostática, saliva, secreção nasal e brônquica, pele e biles (Pallo-Zimmerman *et al.*, 2010).

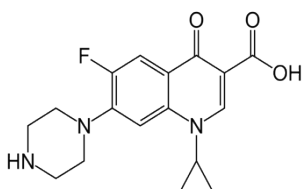


Figura 9: Estrutura molecular da ciprofloxacina (Fonte: Wikipédia, <http://en.wikipedia.org/wiki/Ciprofloxacin>).

3.1.3. Difloxacin – segunda geração

A difloxacin (figura 10) apresenta na posição 1 um anel fenil (Martinez *et al.*, 2006) que lhe confere uma atividade acrescida contra bactérias Gram-positivas (Ismail, 2007). *In vitro* tem uma excelente atividade contra um largo espectro de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas aeróbias e anaeróbias, compreendendo a maioria das espécies e estirpes de *Klebsiella*, *Staphylococcus*, *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Campylobacter*, *Shigella*, *Proteus*, *Pasteurella*, *Mycoplasma*, *Rickettsia* e *Chlamydia* (Fernández-Varón *et al.*, 2006). Após administração oral é rapidamente absorvida e, aproximadamente, 50% liga-se às proteínas plasmáticas em circulação. A difloxacin é, inicialmente, metabolizada por glucuronoconjugação hepática e, posteriormente, é excretada através da bÍlis. Por conseguinte, 80% da molécula é eliminada nas fezes. No cão, a eliminação renal corresponde a 5% do total, tornando-se uma boa escolha para aplicação em animais insuficientes renais. De salientar que a glucuronoconjugação torna o seu uso impraticável em gatos, já que estes animais não possuem esta via enzimática e, por isso, a difloxacin é muito tóxica nesta espécie. Devido à concentração que atinge no fígado e na bÍlis, a sua aplicação em infeções hepatobiliares é muito recomendável. É também indicada para o tratamento de infeções suscetíveis do trato urinário inferior, da pele e dos tecidos moles. Como se acumula no tecido ósseo tem indicação para o tratamento de osteomielites (Pallo-Zimmerman *et al.*, 2010).

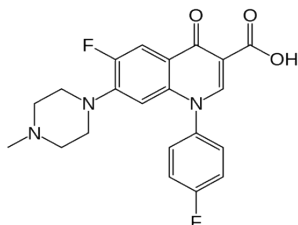


Figura 10: Estrutura molecular da difloxacin (Fonte: Wikipédia, <http://en.wikipedia.org/wiki/Difloxacin>).

3.1.4. Enoxacin – segunda geração

A enoxacin (figura 11) tem um efeito bactericida rápido em bactérias Gram-positivas e em Gram-negativas incluindo *Pseudomonas aeruginosa* e Enterobacteriaceae. No Homem apresenta uma biodisponibilidade de 77 a 90%, grande volume de distribuição e o seu tempo de semi-vida estima-se entre as 3,3 horas e as 5 horas (Hamel, Mottet, Audran, Costa & Bressole, 2000).

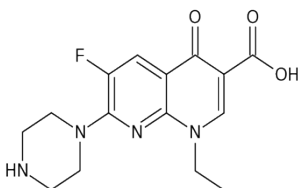


Figura 11: Estrutura molecular da enoxacin (Fonte: Wikipédia, <http://en.wikipedia.org/wiki/Enoxacin>).

3.1.5. Enrofloxacin – segunda geração

A enrofloxacin (figura 12) mostra na posição 1 o grupo ciclopropil (Martinez *et al.*, 2006). Após administração oral, esta molécula é rapidamente absorvida e quase por completo, ligando-se a cerca de 27% das proteínas plasmáticas. As concentrações mais elevadas são atingidas na biliar, fígado, rins, pulmões e sistema reprodutor (incluindo a próstata). A enrofloxacin é metabolizada a nível hepático e eliminada pelos rins. Devido à sua distribuição é um excelente antibiótico para o tratamento de infeções do trato urinário inferior, prostatites, hepatite supurativa e pneumonias. Também parece ter boa penetração a nível ósseo e dérmico sendo, por isso, útil no tratamento de piodermites e osteomielites. No trato gastrointestinal também sofre acumulação estando indicado o seu uso em casos de colite ulcerativa histiocítica sensível a antibióticos e que é comum em Boxers (Palo-Zimmerman *et al.*, 2010). Este composto tem um espectro de atividade alargado, semelhante ao da ciprofloxacin (Cester & Toutain, 1997).

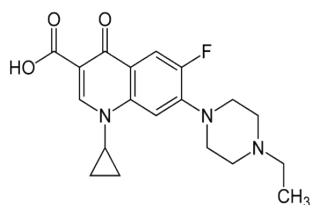


Figura 12: Estrutura molecular da enrofloxacin (Fonte: Wikipédia, <http://en.wikipedia.org/wiki/Enrofloxacin>).

3.1.6. Fleroxacin – segunda geração

A fleroxacin (figura 13) tem um largo espectro de ação sobre microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos, incluindo *Pseudomonas aeruginosa* e Enterobacteriaceae. Esta molécula pode ser usada em infeções urogenitais, em especial, na prostatite bacteriana crónica (Gasser, Graversen & Madsen, 1987). Em humanos é absorvida rapidamente por via oral e apesar de somente 23% se ligar às proteínas plasmáticas, ela exibe uma excelente distribuição sistémica. Em pacientes com insuficiência renal a dose deverá ser ajustada (Stuck, Kim & Frey, 1992).

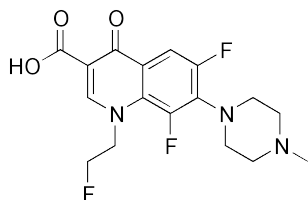


Figura 13: Estrutura molecular da fleroxacin (Fonte: Wikipédia, <http://en.wikipedia.org/wiki/Fleroxacin>).

3.1.7. Lomefloxacin – segunda geração

A lomefloxacin (figura 14) é uma fluoroquinolona com um amplo espectro de ação (Gram-negativas e Gram-positivas), semelhante ao da enoxacin, fleroxacin, norfloxacin e ofloxacin. No Homem, a sua semi-vida é de aproximadamente 7 - 8 horas, sendo excretada na urina em elevada concentração (Blum, Schultz & Schentag, 1990).

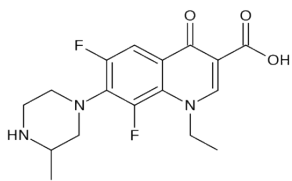


Figura 14: Estrutura molecular da lomefloxacin (Fonte: Wikipédia, <http://en.wikipedia.org/wiki/Lomefloxacin>).

3.1.8. Balofloxacin – terceira geração

A balofloxacin (figura 15) tem na posição 7 um grupo metilaminopiperidina e, na posição 8, um grupo metoxilo. É muito eficaz em organismos Gram-positivos, atuando em estafilococos, em pneumococos multi-resistentes e em bactérias Gram-negativas. A sua metabolização é feita a nível renal (Bian, Tian, Zhang, Xu, Li & Cao, 2007), sendo que 70 a 80% do composto é excretado na urina sem qualquer tipo de metabolização (Kozawa *et al.*, 1996).

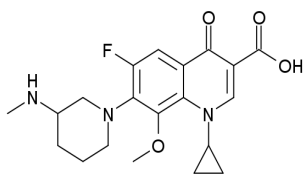


Figura 15: Estrutura molecular da balofloxacin (Fonte: Wikipédia, <http://en.wikipedia.org/wiki/Balofloxacin>).

3.1.9. Danofloxacin – terceira geração

A danofloxacin (figura 16) tem um amplo espectro de ação contra bactérias e micoplasmas (Sarasola *et al.*, 2002). É muito eficaz na doença respiratória causada por *Pasteurella* spp. e *Mannheimia* spp. (Sappal, Chaudhary, Sandhu & Sidhu, 2009) e o seu efeito pós-antibiótico é relativamente prolongado (Sarasola *et al.*, 2002).

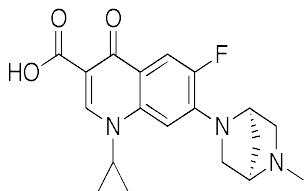


Figura 16: Estrutura molecular da danofloxacin (Fonte: Wikipédia, <http://en.wikipedia.org/wiki/Danofloxacin>).

3.1.10. Grepafloxacin – terceira geração

A grepafloxacin (figura 17) é uma fluoroquinolona de amplo espectro de ação. Tem uma boa capacidade de penetração nos tecidos e sofre acumulação nas células fagocíticas (Niwa *et al.*, 2001). Nos humanos é metabolizada principalmente a nível hepático e excretada nas fezes (Efthymiopoulos, 1997); somente 10 a 13% é eliminada pela urina sem alteração (Kozawa *et al.*, 1996).

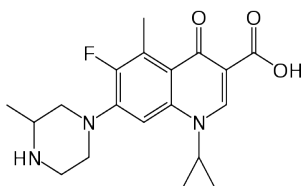


Figura 17: Estrutura molecular da grepafloxacin (Fonte: Wikipédia, <http://en.wikipedia.org/wiki/Grepafloxacin>).

3.1.11. Levofloxacin – terceira geração

A levofloxacin (figura 18) tem ação bactericida sobre microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos e uma atividade moderada em anaeróbios (Bryson, 1994). Esta molécula também apresenta atividade contra *Mycoplasma*, *Chlamydia*, *Legionella* e *Mycobacteria* (Fish & Chow, 1997). Exibe boa absorção e boa distribuição após toma oral (Bryson, 1994).

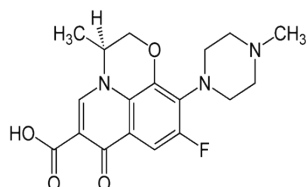


Figura 18: Estrutura molecular da levofloxacin (Fonte: Wikipédia, <http://en.wikipedia.org/wiki/Levofloxacin>).

3.1.12. Marbofloxacin – terceira geração

A marbofloxacin (figura 19) é uma molécula de largo espectro de ação, particularmente, em microrganismos Gram-negativos. Após administração oral é rapidamente e, quase por completo absorvida, mostrando uma ligação às proteínas plasmáticas residual (9% nos cães e 7% nos gatos). Apresenta um bom volume de distribuição e uma boa penetração tecidual (Pallo-Zimmerman *et al.*, 2010). A marbofloxacin tem um tempo de semi-vida relativamente longo quando comparada com outras fluoroquinolonas (Haritova, Rusenova, Parvanov, Lashev & Fink-Gremmels, 2006), sendo metabolizada 10 a 15% no fígado e excretada pela biliar. Nos cães, aproximadamente 40% é excretada na urina de forma inalterada (nos gatos até 70%) sendo a restante excretada pelas fezes. Devido à sua acumulação na urina é recomendada a sua utilização em infecções do aparelho urinário. Também está indicado o seu uso em dermatites e infecções de tecidos moles (Pallo-Zimmerman *et al.*, 2010).

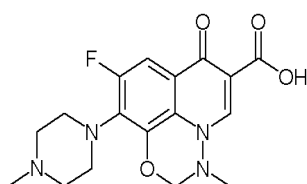


Figura 19: Estrutura molecular da marbofloxacin (Fonte: Wikipédia, <http://en.wikipedia.org/wiki/Marbofloxacin>).

3.1.13. Besifloxacina – quarta geração

A besifloxacina (figura 20) é a 8-clorofluoroquinolona (McDonald & Blondeau, 2010). Na posição 5 e 8 apresenta um átomo de hidrogénio e um de cloro que potencializa a fototoxicidade (Roy, Nandi, Das & Pal, 2011). É usada apenas sob a forma de colírio em infecções oftalmológicas e apresenta um espectro de ação amplo que abrange bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, mostrando-se ativa contra *Streptococcus pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* mesmo em isolados multiresistentes (Roy *et al.*, 2011).

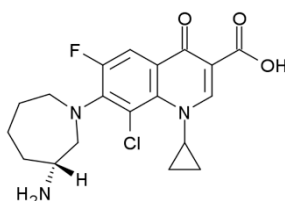


Figura 20: Estrutura molecular da besifloxacina (Fonte: Wikipédia, <http://en.wikipedia.org/wiki/Besifloxacin>).

3.1.14. Clinafloxacin – quarta geração

A clinafloxacin (figura 21) é uma quinolona dihalogenada que mostra um espectro de atividade lato sendo, particularmente, ativa contra cocos Gram-positivos (Wise, Jones, Das & Andrews, 1998) mas atuando, igualmente, em Gram-negativos, Enterobacteriaceae, organismos não fermentativos, agentes eucariotas patogénicos intracelulares e anaeróbios (Randinitis, Brodfuehrer, Eiseman & Vassos, 2001).

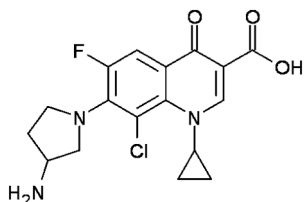


Figura 21: Estrutura molecular da clinafloxacin (Fonte: Wikipédia, <http://en.wikipedia.org/wiki/Clinafloxacin>).

3.1.15. Garenoxacin – quarta geração

A garenoxacin (figura 22), assim como as fluoroquinolonas mais recentes, regista uma maior atividade em cocos Gram-positivos, incluindo *S. pneumoniae* multiresistentes (Andes & Craig, 2003). No Homem, e apesar de se ligar às proteínas plasmáticas na ordem dos 75%, a garenoxacin apresenta um bom volume de distribuição e um tempo de semi-vida de 14 horas. Apesar de sofrer metabolização hepática e eliminação renal, cerca de 40% é excretado pela urina na sua forma original (Wart *et al.*, 2004).

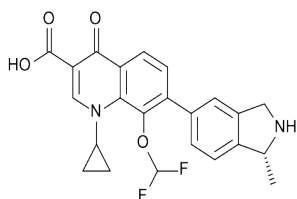


Figura 22: Estrutura molecular da garenoxacin (Fonte: Wikipédia, <http://en.wikipedia.org/wiki/Garenoxacin>).

3.2. Mecanismo de ação

Verificou-se que as fluoroquinolonas causavam danos no ADN de várias espécies bacterianas, originando defeitos no superenrolamento negativo por inibição da ADN girase que, conjuntamente com outras proteínas, modulam a topologia da cadeia dupla de ADN. Esta enzima bacteriana exerce um papel fundamental na replicação, transcrição e tradução (Martinez *et al.*, 2006) e apesar dos mamíferos também necessitarem de uma proteína homóloga, as fluoroquinolonas têm maior afinidade para as ADN girases bacterianas que, como já foi mencionado, tem uma extensa homologia com a LiTOPII. Esta seletividade para o substrato permite que as fluoroquinolonas exerçam uma rápida atividade bactericida sem efeitos adversos graves no hospedeiro (Pallo-Zimmerman *et al.*, 2010).

A holoenzima alvo é um heterotetrâmero composto por duas subunidades – *gyr A* e *gyr B* (A_2B_2). A subunidade *gyr A* liga-se ao ADN, mediando a quebra de uma das cadeias, a passagem da cadeia inteira pelo corte e a religação da cadeia clivada (Martinez *et al.*, 2006).

Quando a ADN girase é exposta a uma fluoroquinolona ocorre a formação de uma ligação irreversível entre o antibiótico, a ADN girase e a cadeia de ADN clivada. A estabilização do complexo de clivagem impede a progressão da replicação e da transcrição conduzindo à fragmentação do cromossoma e à consequente morte celular. O efeito antiproliferativo das fluoroquinolonas nas bactérias pode encontrar justificação em três tipos de mecanismos de morte celular; um dos mecanismos é comum a todas as quinolonas e requer a síntese de ARN e de proteína, ocorrendo em células em divisão ativa; o segundo mecanismo pode ocorrer em bactérias incapazes de se dividir, pois não necessita de ARN ou síntese proteica, estando associado à incapacidade de separação das subunidades das girases bacterianas que formam um complexo quaternário; por fim, o terceiro mecanismo não necessita de células em divisão ativa, mas a presença de ARN e a síntese proteica é necessária para que ocorra o aprisionamento dos complexos da topoisomerase IV no ADN (Martinez *et al.*, 2006). Desta forma, as quinolonas exercem o seu papel antibacteriano por imobilizarem a ADN girase das bactérias Gram-negativas e a topoisomerase IV das Gram-positivas.

3.3. Farmacocinética e farmacodinâmica

As fluoroquinolonas têm uma ação bactericida rápida (Lees & AliAbadi, 2002). As moléculas desenvolvidas na década de 80 são de administração *per os*, apesar de algumas poderem ser injetáveis. As fluoroquinolonas mais recentes estão disponíveis em formulações orais e endovenosas, apresentando posologia flexível. As formulações líquidas contêm sais solúveis livres dissolvidos em soluções aquosas estáveis. As formulações sólidas contêm o princípio ativo na forma de betaína ou, ocasionalmente, na forma de cloridrato (Martinez *et al.*, 2006). Após a administração oral de moléculas como a marbofloxacin, a enrofloxacin, a difloxacin e a orbifloxacin, ocorre uma absorção de mais de 80% pelo trato gastrointestinal e uma biodisponibilidade de 100%. A ciprofloxacin também é absorvida acima dos 80% mas apresenta apenas uma biodisponibilidade de 40% no Cão e 33% no Gato. No caso da enrofloxacin, 10 a 40% da substância absorvida é convertida em ciprofloxacin pelos cães e pelos gatos (Pallo-Zimmerman *et al.*, 2010).

As fluoroquinolonas mais recentes têm um volume de distribuição maior – melhor penetração tecidual e ampla distribuição pelos fluidos corporais – devido à sua fraca ligação com as proteínas plasmáticas e a um tempo de semi-vida maior, comparativamente, às moléculas de primeira e de segunda geração (Emmerson & Jones, 2003). Desta forma é possível uma única administração diária e, por conseguinte, uma maior cooperação por parte dos clientes. As doses terapêuticas no plasma são facilmente atingidas e a acumulação nos macrófagos é excelente (Emmerson & Jones, 2003). Como moléculas altamente lipossolúveis que são, a sua absorção por via oral, via intramuscular ou via subcutânea é elevada (Lees & AliAbadi, 2002). O pico máximo de concentração sérica varia consoante a espécie animal (no Cão o pico da enrofloxacin é atingido às 0,9 horas, *per os*) (Górniak, 2006). Devido ao seu caráter lipofílico atingem facilmente concentrações terapêuticas no leite, no líquido sinovial, no líquido prostático, no sêmen, nos fluidos uterinos e no líquido cefalorraquidiano, alcançando também concentrações elevadas no meio intracelular. As concentrações tecidulares são, em geral, iguais ou superiores às concentrações plasmáticas e também têm sido descritas concentrações elevadas ao nível do osso (Lees & AliAbadi, 2002). Para além do mecanismo de difusão passiva é possível que existam mecanismos não-passivos a nível intestinal que favoreçam a sua absorção. Foi descrito o transporte ativo através da membrana apical do enterócito em compostos como a levofloxacin, a ciprofloxacin e a norfloxacin (Martinez *et al.*, 2006). Neste caso é essencial que a molécula esteja bem dissolvida no momento em que chega ao segmento do intestino delgado onde vai ser absorvida. Pelo contrário poderá ocorrer uma fraca biodisponibilidade oral e uma reduzida concentração plasmática, caso a absorção

intestinal seja insuficiente por, por exemplo, saturação dos transportadores ou competição com outras moléculas pelos mesmos transportadores. Os transportadores de membrana intestinais podem também ser importantes na eliminação do antibiótico, resultando numa secreção ativa a partir do sangue de retorno do intestino, como se verifica na ciprofloxacina e na norfloxacina. Todavia, a secreção intestinal pode envolver transportadores específicos e diferentes para as várias fluoroquinolonas (Martinez *et al.*, 2006).

No que diz respeito às vias de eliminação das fluoroquinolonas, estas são variáveis e dependem da molécula e da espécie alvo. Martinez *et al.* (2006) considera que as fluoroquinolonas devem ser categorizadas de acordo com a sua via primária de eliminação (figura 23).



Figura 23: Vias de metabolização de algumas fluoroquinolonas (Martinez *et al.*, 2006).

No entanto, moléculas como a levofloxacin que têm um metabolismo pouco marcado, sendo maioritariamente excretadas inalteradas na urina. As vias metabólicas que estão envolvidas são a da glucuronoconjugação (clinafloxacin, grepafloxacin, esparfloxacin e moxifloxacin), a da N-oxidação e a da desmetilação (levofloxacin e esparfloxacin) com envolvimento do citocromo P450 (Martinez *et al.*, 2006). Geralmente, as fluoroquinolonas sofrem inicialmente reações de hidroxilação e de oxidação que as transforma em oxoquinolonas sendo, posteriormente, conjugadas com o ácido glucurónico e secretadas pela urina e biliar (Lees & AliAbadi, 2002). Como já foi mencionado anteriormente, outro mecanismo que poderá estar envolvido na sua excreção é a secreção ativa destes compostos através da mucosa intestinal. Em algumas espécies ocorre recirculação enterohepática por ação da betaglucuronidase sobre os conjugados (Lees & AliAbadi, 2002), aumentando o tempo de semi-vida do composto no organismo. Por exemplo, os cães eliminam 80% da dose endovenosa de difloxacin pelas fezes, em grande parte, através de secreção biliar. Na biliar, 72 a 80% do fármaco está na forma de éster glucuronido e apenas 6 a 9% da molécula não está transformada. O glucuronido parece ser hidrolizado no intestino, ficando novamente

disponível para ser reabsorvido. Assim, nos cães a semi-vida da difloxacina após a administração oral é de, aproximadamente, 9,4 horas (Martinez *et al.*, 2006), enquanto noutras espécies é mais reduzida. A importância da eliminação por via renal depende da fluoroquinolona mas, geralmente, as concentrações urinárias mantêm-se altas durante pelo menos 24 horas, quando esta é a via de excreção por excelência. Outros compostos são excretados através do túbulo proximal pelo sistema transportador de ácidos orgânicos, sendo a sua semi-vida de 2 a 7 horas dependendo da fluoroquinolona e da espécie (Lees & AliAbadi, 2002). No caso da levofloxacin e da gatifloxacin são, inicialmente, eliminadas via renal e a levofloxacin chega a exceder a taxa de eliminação da creatinina em cerca de 60%, o que sugere o envolvimento ativo da filtração glomerular e dos túbulos renais (Martinez *et al.*, 2006). Adicionalmente, alguns metabolitos podem ter atividade antibiótica como é o caso da enrofloxacin que é convertida em ciprofloxacin e da danofloxacin que é transformada em N-desmetildanofloxacin (Lees & AliAbadi, 2002).

A dose e o fármaco a seleccionar dependem de vários fatores como a qualidade da função hepática e renal do animal, o uso concomitante de outras medicações que comprometam a absorção, a penetração tecidual e a sede da infeção (Pallo-Zimmerman *et al.*, 2010). O estado em que se encontra o sistema imunitário e o tipo/frequência do alimento que é dado ao paciente também influenciam a biodisponibilidade do fármaco a nível sérico (Martinez *et al.*, 2006). A avaliação da resposta do hospedeiro a uma infeção poderá facilitar a otimização da dosagem através da utilização da farmacocinética e da farmacodinâmica. De igual modo, o conhecimento das características de ligação do fármaco e a sua capacidade de se difundir pelas barreiras biológicas ajudará os clínicos a definir a dose terapêutica apropriada (Martinez *et al.*, 2006).

As fluoroquinolonas apresentam uma ação dependente da sua concentração, com a característica de haver apenas uma pequena diferença entre a concentração mínima inibitória (CMI) e a concentração mínima bactericida (CMB). Estas moléculas por penetrarem na célula bacteriana de forma rápida através de porinas atravessam facilmente as membranas e, devido à sua alta lipossolubilidade, a concentração intrabacteriana rapidamente atinge um equilíbrio com o meio exterior (Lees & AliAbadi, 2002).

Curiosamente, as fluoroquinolonas exibem um efeito paradoxal; as curvas de crescimento bacteriano mostram que quando é atingida a CMI, o fármaco exibe um efeito bacteriostático. À medida que a concentração aumenta e atinge a concentração bactericida ótima, o fármaco demonstra um efeito bactericida, mas se ultrapassar este valor o aumento da sua concentração leva a uma redução do efeito bactericida. Estas diferenças podem encontrar explicação no

facto da concentração necessária para inibir o superenrolamento do ADN ser distinta da concentração necessária para inibir o crescimento bacteriano. Evidências recentes mostram que a reação de superenrolamento da girase tem uma sensibilidade menor aos fármacos que o crescimento bacteriano (Martinez *et al.*, 2006).

3.4. Toxicidade, efeitos secundários e interações

Os efeitos adversos das fluoroquinolonas são, na sua grande maioria, dependentes da espécie e da dose administrada. A maioria destes efeitos secundários têm pouca relevância e é reversível após interrupção do tratamento. Após administração oral é comum a ocorrência de vômitos, diarreia e anorexia (Pallo-Zimmerman *et al.*, 2010) e já foram descritos casos de fotossensibilidade em humanos, cães e gatos e alterações do sistema nervoso central (incluindo convulsões, ataxia, tonturas, cefaleia, insónia, inquietação, sonolência e tremores) e cristalúria (Martinez *et al.*, 2006). Os efeitos no sistema nervoso central decorrem do efeito antagonista das fluoroquinolonas junto dos recetores do ácido γ -aminobutírico e os fatores de risco para o surgimento de convulsões incluem a epilepsia, medicação em altas doses e o uso simultâneo de AINEs (Pallo-Zimmerman *et al.*, 2010). Deste modo, a administração deste grupo de antibióticos está contraindicada em animais com epilepsia (Górniak, 2006). Contudo, Lees e AliAbadi (2002) referem que as fluoroquinolonas podem ser administrados em altas concentrações, em canídeos e felídeos epiléticos, desde que a sua administração seja monitorizada. Em animais que apresentam insuficiência renal, a administração destes fármacos deve ser cautelosa visto que são excretados, na sua maioria, por esta via. A indução de artropatias está descrita em cães jovens, devido ao efeito erosivo que as fluoroquinolonas produzem nas cartilagens de crescimento por alterarem a síntese de proteoglicano (Górniak, 2006; Pallo-Zimmerman *et al.*, 2010). Desta forma, o seu uso está contraindicado em animais com menos de 1 ano em raças pequenas, menos de 18 meses em raças grandes (Lees & AliAbadi, 2002) e em cadelas gestantes devido aos efeitos teratogénicos observados. Está igualmente documentada a ocorrência de degeneração difusa da retina e cataratas subcapsulares em gatos (Górniak, 2006).

A interação com antiácidos que contenham magnésio ou alumínio e a administração simultânea de sucralfato conduzem a uma menor absorção intestinal. Por outro lado, a teofilina e a antipirina reduzem o metabolismo hepático destas moléculas dependendo da fluoroquinolona (Lees & AliAbadi, 2002).

3.5. Resistências

As resistências às fluoroquinolonas podem surgir por mutações na ADN girase ou na topoisomerase IV (Pallo-Zimmerman *et al.*, 2010). As modificações aminoacídicas que podem conferir resistência bacteriana foram mapeadas num subdomínio denominado QRDR (*Quinolone Resistance-Determining Region*) na *gyr A* e na *par C* (Martinez *et al.*, 2006). Além das mutações génicas, a resistência também pode resultar de alterações na permeabilidade da parede celular bacteriana ou no desenvolvimento de um efluxo ativo dependente de ATP ocorrendo, nestes casos, resistências cruzadas a múltiplas classes de antibióticos por serem mecanismos pouco específicos. A resistência a fluoroquinolonas pode ocorrer por pressão seletiva tendo sido descrito, recentemente, um plasmídeo que codificava para resistência na *Klebsiella pneumoniae* e, posteriormente, na *Escherichia coli*. Até à data não estão descritos mecanismos enzimáticos de inativação ou de modificação de quinolonas e a sua ocorrência é pouco provável, uma vez que esta classe de antibióticos é sintética e não tem um análogo natural (Martinez *et al.*, 2006).

Por fim, as fluoroquinolonas mais recentes como a gatifloxacina, a moxifloxacina e a besifloxacina têm características estruturais que lhes concedem um menor potencial para o desenvolvimento de resistências bacterianas, comparativamente às moléculas mais antigas (McDonald, 2010).

CAPÍTULO IV. OBJETIVOS

Atendendo a que a topoisomerase II codificada por *L. infantum* apresenta uma extensa homologia com as ADN girases bacterianas, pretendeu-se avaliar o efeito das várias gerações de fluoroquinolonas testando, *in vitro*, a sua atividade inibitória na replicação parasitária. Tendo, assim, como objetivo determinar quais as gerações e a que concentração serão mais eficazes no combate a este protozoário. Para tal, pretendeu-se estabelecer uma relação filogenética entre as enzimas dos microrganismos onde se sabe que estas moléculas atuam e a das enzimas existentes em *L. infantum*. E, além disso, pretendeu-se avaliar de que forma alteravam a sua morfologia e motilidade.

CAPÍTULO V. MATERIAIS E MÉTODOS

Parasitas

As formas amastigotas de *L. infantum* foram obtidas por punção aspirativa de agulha fina na articulação costo-condral de um canídeo com Leishmaniose, assistido no serviço de consulta externa do Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária. O diagnóstico foi confirmado pela técnica de imunofluorescência indireta e por deteção de ADN parasitário através da técnica de PCR. À data da punção o animal ainda não havia sido submetido a qualquer tratamento leishmanicida. Para a diferenciação das formas promastigota, os parasitas foram cultivados e mantidos em meio RPMI-1640 (Gibco[®], Life Technologies, New York, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino termo-inactivado (Gibco[®]), hemina a 5 µg/mL (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, USA), 200 mM de L-glutamina (Gibco[®] GlutaMAX[™]), aminoácidos não essenciais (Gibco[®] MEM Non-Essential Amino Acids Solution), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco[®] Pen-Strep) e 10% (v/v) de urina masculina humana (Warburg, Shoshana & Deutsch, 2008) filtrada (Millipore Millex[®] GV, Massachusetts, USA). As formas promastigota foram mantidas sob atmosfera ambiente, sem fonte externa de CO₂ e incubadas entre 20-24°C.

Testagem de Fluoroquinolonas

Após subcultura, os promastigotas de *L. infantum*, em fase de crescimento logarítmico, foram distribuídos em placas de cultura com 96 poços a uma concentração média de 1×10^5

células/mL. As soluções-stock das fluoroquinolonas testadas (Sigma-Aldrich®) foram dissolvidas numa solução de hidróxido de sódio (1 M, Sigma-Aldrich®). Estas soluções foram posteriormente diluídas e subaliquotadas em soluções de concentrações de 0,1; 1; 10 e 100 µM.

No presente estudo foram avaliados os efeitos anti-leishmania das seguintes moléculas: ácido nalidíxico da primeira geração; ciprofloxacina, difloxacina, enoxacina, enrofloxacina, fleroxacina e lomefloxacina da segunda geração; balofloxacina, danofloxacina, grepafloxacina, levofloxacina e marbofloxacina da terceira geração; besifloxacina, clinafloxacina e garenoxacina da quarta geração.

A exposição dos promastigotas foi realizada em duplicado para cada antibiótico e concentração, efetuando-se a renovação do meio e do fármaco a cada 24 horas durante três ou sete dias, executando-se as seguintes operações: aspiração do conteúdo de cada poço para um tubo pequeno de centrífuga (Eppendorf, Hamburg, Germany), centrifugação a 1250 g durante 10 minutos, eliminação do sobrenadante e ressuspensão do *pellet* celular em meio de cultura fresco com antibiótico na respetiva concentração de teste. Foram ainda mantidos poços, em duplicado, para os controlos negativo (promastigotas sem tratamento), positivo (promastigotas expostos ao antimoníaco de meglumina, 10 mg/mL) e branco (contendo apenas meio de cultura).

Teste de citotoxicidade

A viabilidade dos promastigotas foi determinada por um ensaio colorimétrico com MTS [3-(4,5-dimetiltazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio salino]. Este método baseia-se na metabolização deste produto num composto solúvel (formazano) por algumas enzimas desidrogenases presentes nas células metabolicamente ativas. Antes da leitura espectral, o meio de cultura RPMI-1640 foi substituído por meio F12 sem vermelho de fenol (Gibco® DMEM/F12) e foram adicionados 20 µL de reagente MTS por poço (CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, California, USA). A conversão do MTS em formazano foi quantificada num leitor de absorvância para microplacas regulado para leituras a 490 nm (SpectraMAX 340PC, Molecular Devices, California, USA), após 6 horas de incubação e até à estabilização da reação. A viabilidade celular das formas promastigota, após a exposição aos vários fármacos, foi comparada aos valores de absorvância obtidos nas culturas não tratadas e aos valores obtidos nas culturas tratadas com antimoníaco de meglumina. Em paralelo, procedeu-se diariamente à contagem dos parasitas em hemocitómetro (Câmara de Neubauer) e à apreciação morfológica das formas promastigotas através de microscopia ótica (Olympus CK40, Tokyo, Japan).

Métodos estatísticos

Partindo do pressuposto que a amostra é homogênea e a distribuição dos valores é normal, as absorvâncias e as contagens parasitárias foram analisadas utilizando a anova univariada. Nas hipóteses em que se comparam dois grupos utilizou-se o teste t de Student, sendo o nível de significância definido de $p \leq 0,05$. A análise estatística foi efectuada com o StatPlus® 2009 para Microsoft Excel®.

1. ÁCIDO NALIDÍXICO – Primeira Geração

No ensaio de três dias, as diferenças entre os valores de absorvâncias e entre as contagens parasitárias registradas nas culturas tratadas com ácido nalidíxico não foram estatisticamente significativas (figuras 24A e B).

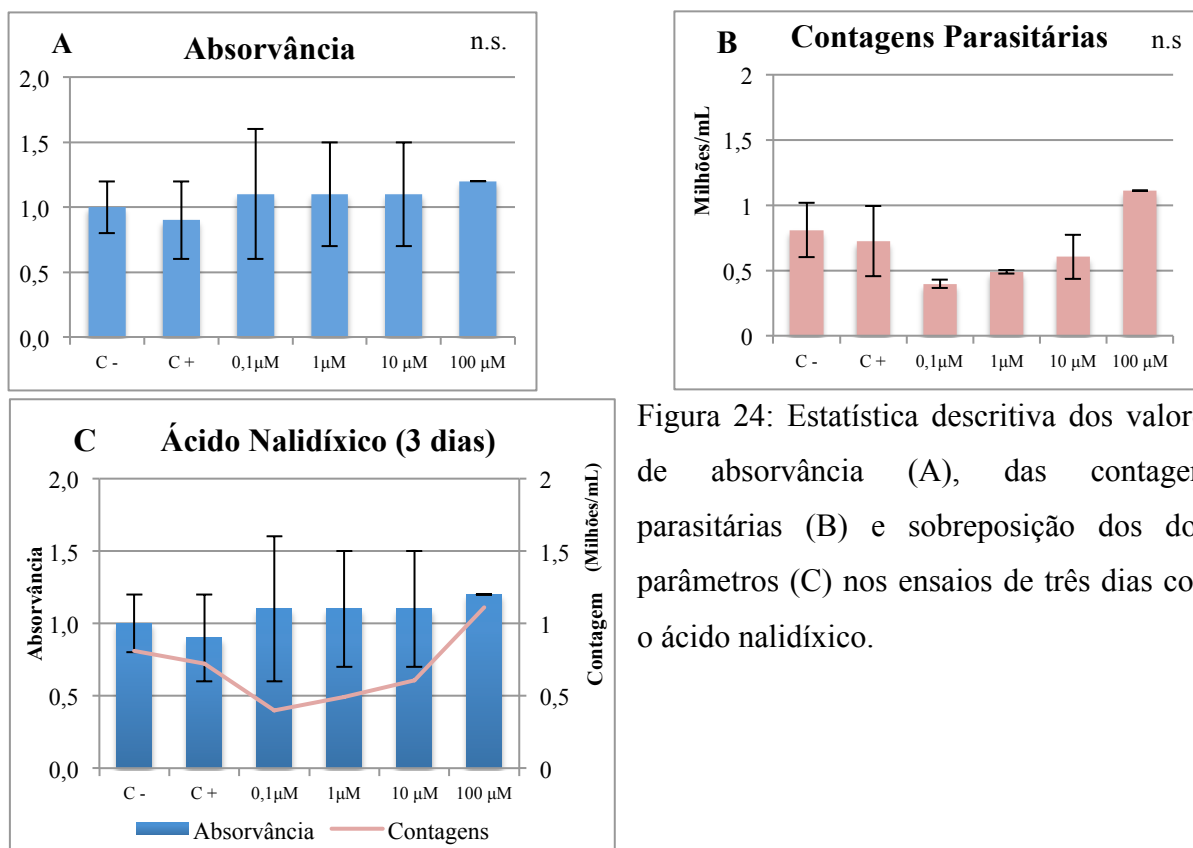


Figura 24: Estatística descritiva dos valores de absorvância (A), das contagens parasitárias (B) e sobreposição dos dois parâmetros (C) nos ensaios de três dias com o ácido nalidíxico.

No ensaio de sete dias, as diferenças nos valores de absorvância registradas foram significativas ($p \leq 0,01$), tendo sido registrado um efeito estatisticamente significativo nas concentrações de 10 ($p \leq 0,01$) e de 100 μM ($p \leq 0,01$) (figura 25A). Relativamente às contagens parasitárias, as diferenças não foram consideráveis (figuras 25B e C).

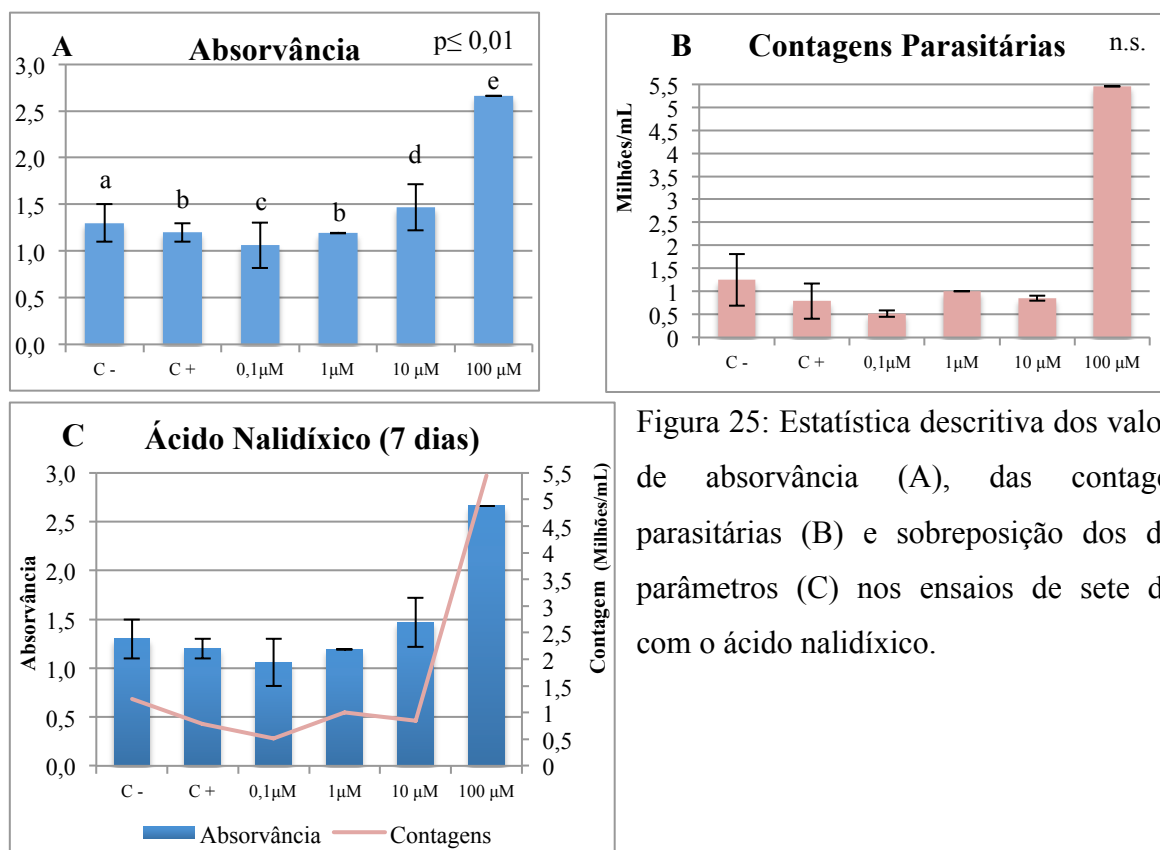


Figura 25: Estatística descritiva dos valores de absorvância (A), das contagens parasitárias (B) e sobreposição dos dois parâmetros (C) nos ensaios de sete dias com o ácido nalidíxico.

2. CIPROFLOXACINA – Segunda Geração

No ensaio de três dias, as diferenças entre os valores de absorvância das culturas tratadas com ciprofloxacina foram significativas ($p \leq 0,01$). Na concentração de 100 μ M foi registrado um efeito significativo ($p \leq 0,05$) (figura 26A). Paralelamente, as contagens parasitárias não apresentaram diferenças estatisticamente relevantes (figuras 26B e C).

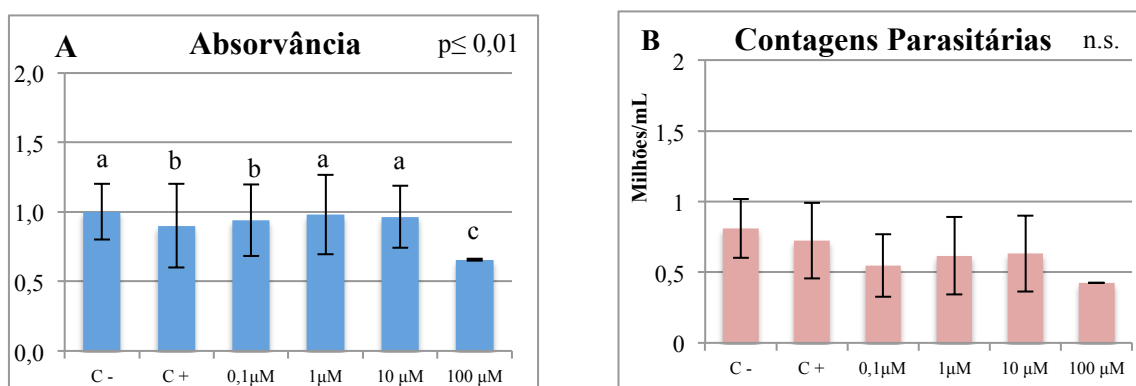


Figura 26: Estatística descritiva dos valores de absorvância (A), das contagens parasitárias (B) e sobreposição dos dois parâmetros (C) nos ensaios de três dias com ciprofloxacina.

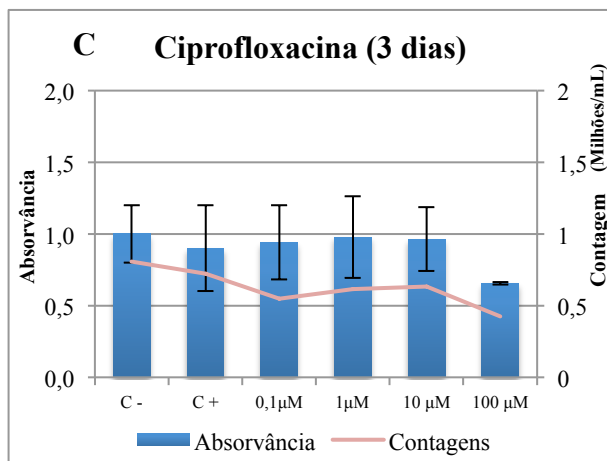


Figura 26: (continuação).

No ensaio de sete dias, as diferenças nos valores de absorvância obtidos também foram estatisticamente significativas ($p \leq 0,01$), tendo as concentrações de $0,1 \mu\text{M}$ ($p \leq 0,01$) e de $100 \mu\text{M}$ ($p \leq 0,05$) de ciprofloxacina registado um efeito significativo (figura 27A). As contagens realizadas não obtiveram diferenças relevantes (figuras 27B e C).

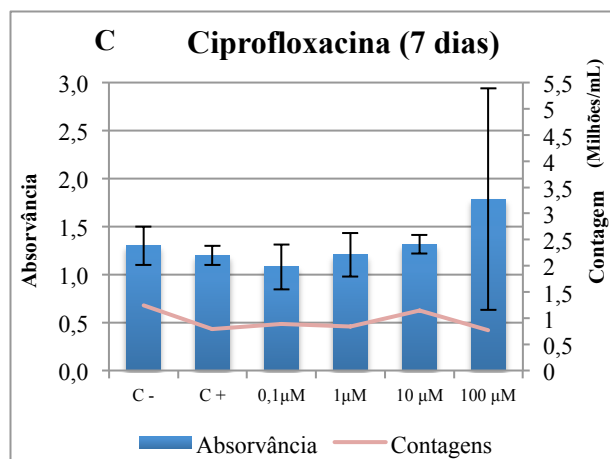
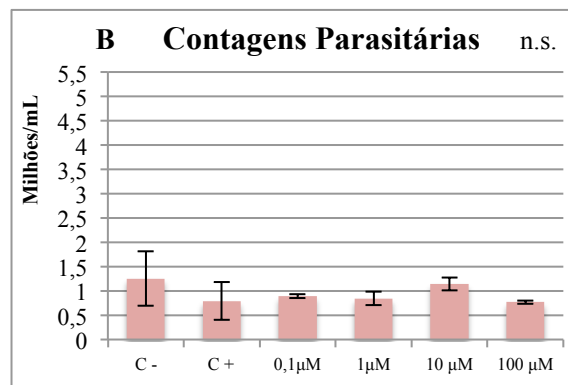
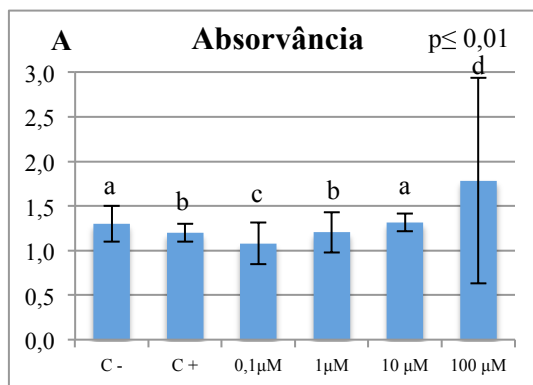


Figura 27: Estatística descritiva dos valores de absorvância (A), das contagens parasitárias (B) e sobreposição dos dois parâmetros (C) nos ensaios de sete dias com ciprofloxacina.

3. DIFLOXACINA – Segunda Geração

No ensaio de três dias, as diferenças entre os valores médios de leitura das absorvâncias nas culturas tratadas com difloxacina foram estatisticamente significativas ($p \leq 0,01$), tendo sido verificado um efeito expressivo à concentração de 100 μM ($p \leq 0,05$) (figura 28A). Relativamente às contagens, as diferenças registadas não foram significativas (figuras 28B e C).

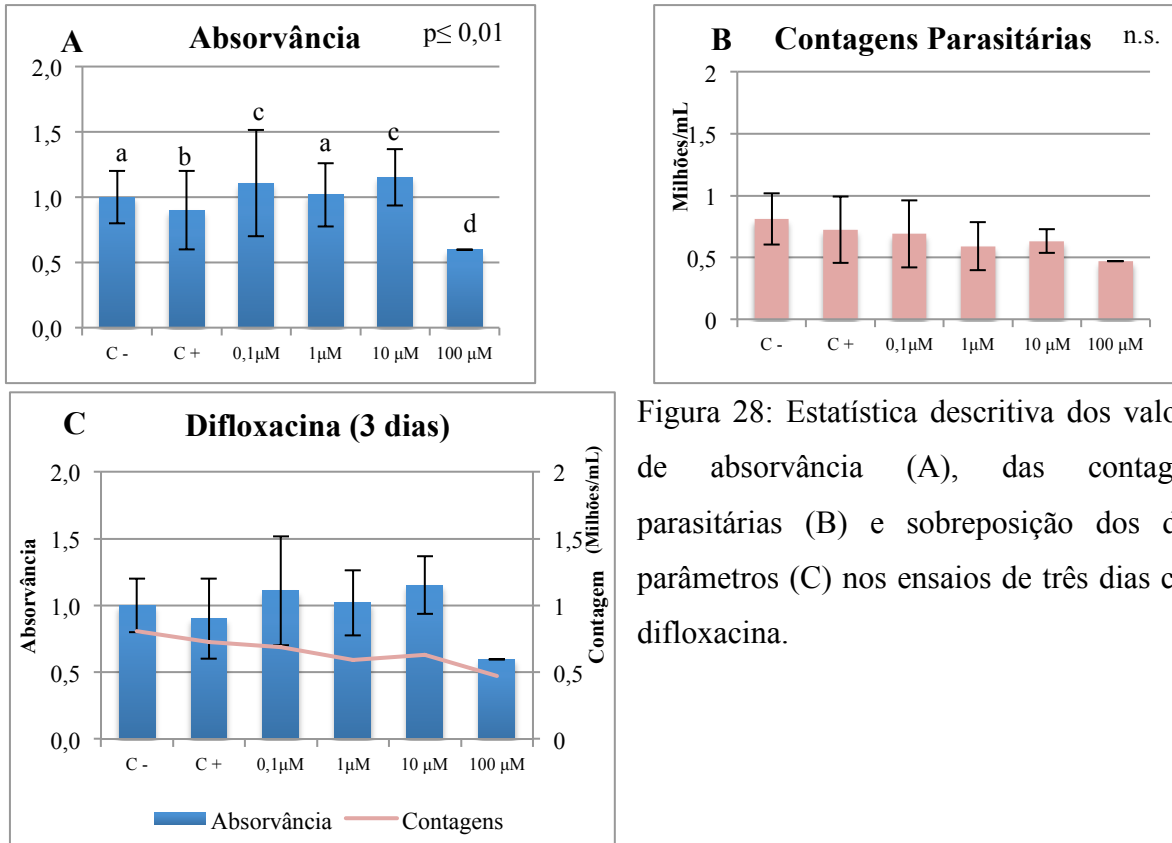


Figura 28: Estatística descritiva dos valores de absorvância (A), das contagens parasitárias (B) e sobreposição dos dois parâmetros (C) nos ensaios de três dias com difloxacina.

No ensaio de sete dias, as culturas tratadas com difloxacina não obtiveram diferenças significativas nos valores de absorvância (figura 29A) nem nas contagens de protozoários, (figuras 29B e C).

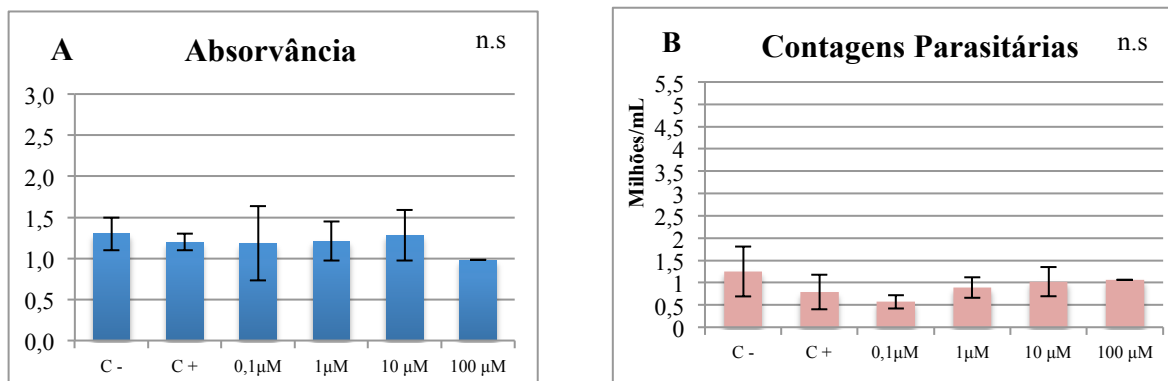


Figura 29: Estatística descritiva dos valores de absorvância (A), das contagens parasitárias (B) e sobreposição dos dois parâmetros (C) nos ensaios de sete dias com difloxacina.

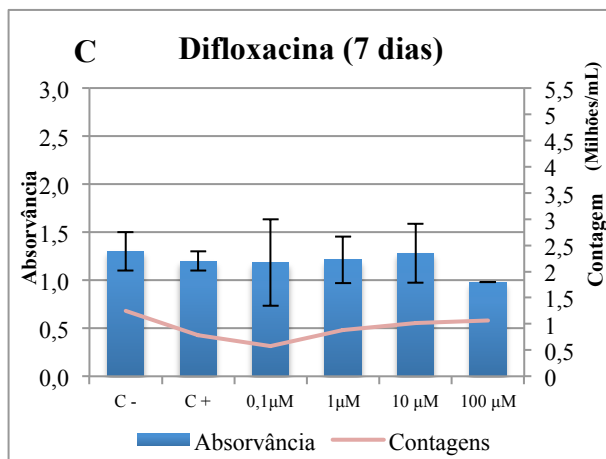


Figura 29: (continuação).

4. ENOXACINA – Segunda Geração

No ensaio de três dias, as diferenças entre os valores de leitura de conversão do MTS nas culturas tratadas com enoxacina foram estatisticamente significativas ($p \leq 0,01$), tendo sido registado um efeito pronunciado à concentração de 100 μM ($p \leq 0,05$) (figura 30A). As contagens parasitárias não obtiveram diferenças significativas (figuras 30B e C).

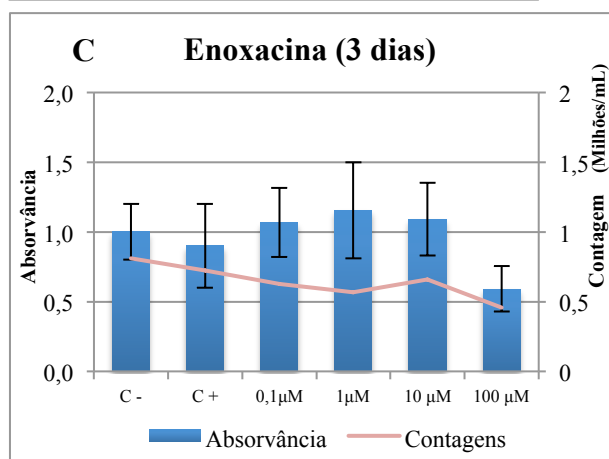
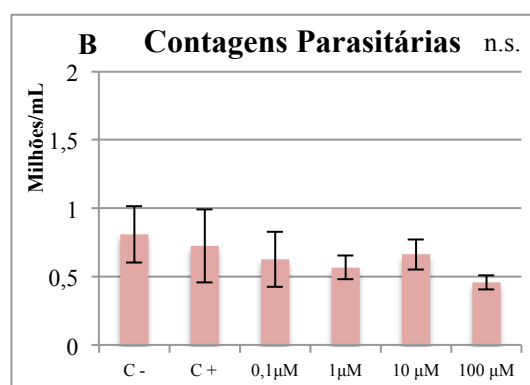
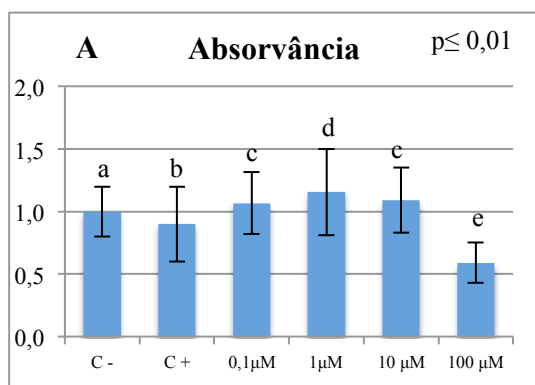


Figura 30: Estatística descritiva dos valores de absorbância (A), das contagens parasitárias (B) e sobreposição dos dois parâmetros (C) nos ensaios de três dias com enoxacina.

No ensaio de sete dias, os valores de leitura de absorvância registaram diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,01$), com um efeito considerável à concentração de 100 μM ($p \leq 0,05$) (figura 31A). Nas contagens parasitárias não foram observadas diferenças significativas (figuras 31B e C).

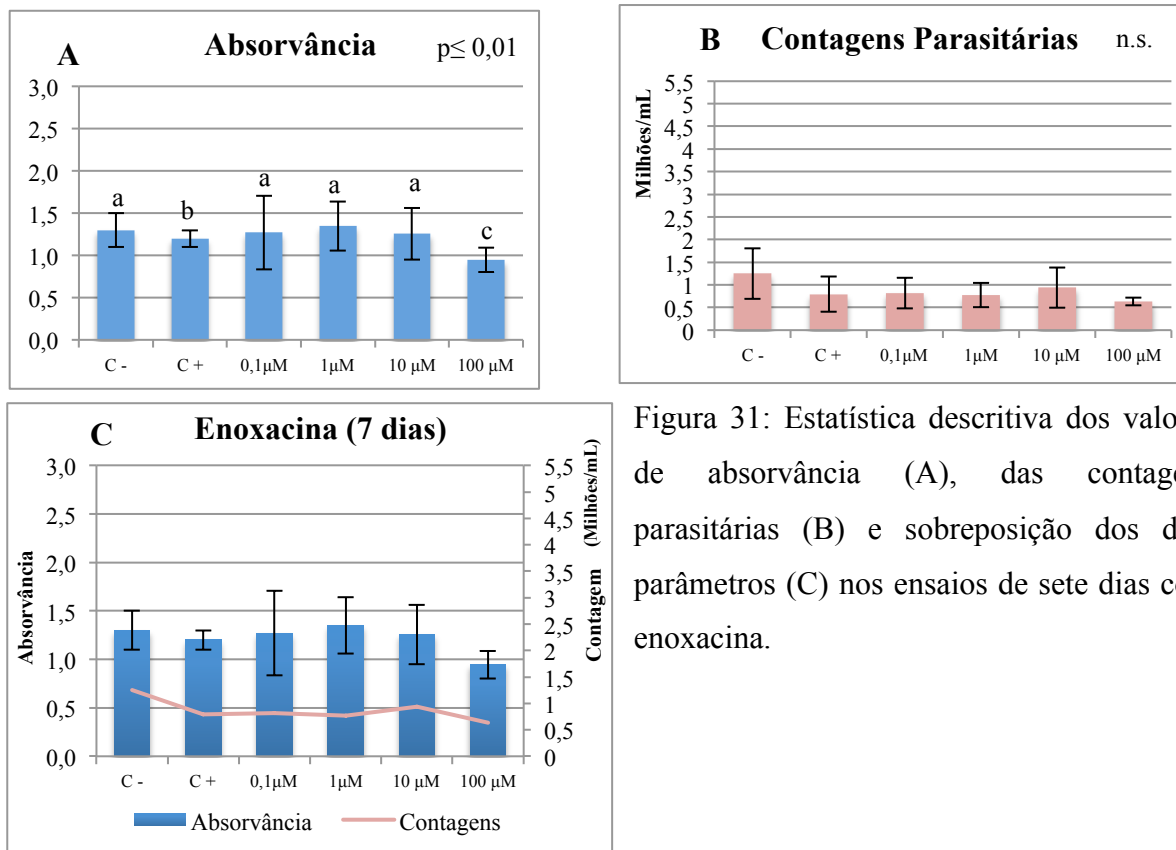


Figura 31: Estatística descritiva dos valores de absorvância (A), das contagens parasitárias (B) e sobreposição dos dois parâmetros (C) nos ensaios de sete dias com enoxacina.

5. ENROFLOXACINA – Segunda Geração

No ensaio de três dias, os valores da absorvância médios nas culturas tratadas com enrofloxacin obtiveram diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,01$), tendo sido demonstrado um efeito relevante à concentração de 100 μM ($p \leq 0,05$) (figura 32A). Em relação às contagens, as diferenças registradas não foram significativas (figuras 32B e C).

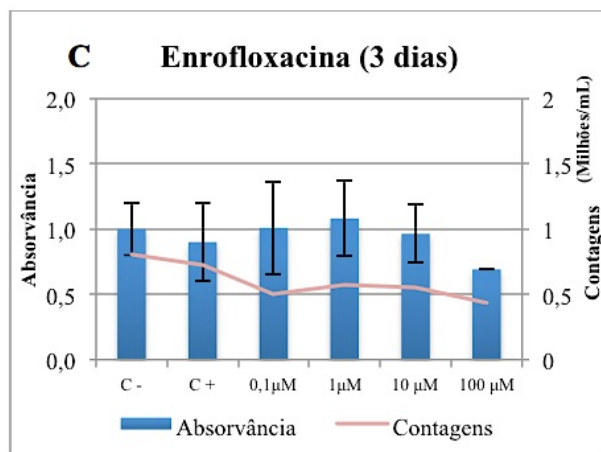
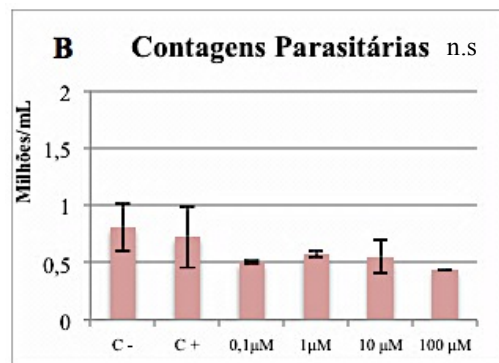
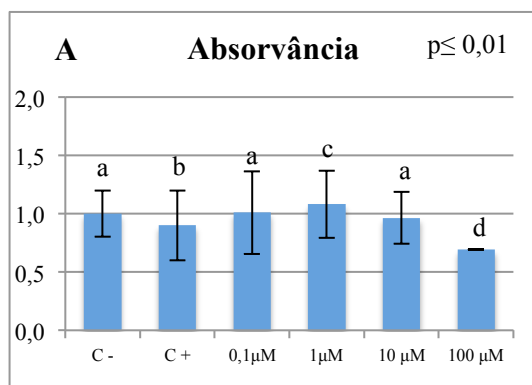


Figura 32: Estatística descritiva dos valores de absorvância (A), das contagens parasitárias (B) e sobreposição dos dois parâmetros (C) nos ensaios de três dias com enrofloxacina.

No ensaio de sete dias, as culturas tratadas com enrofloxacina não manifestaram diferenças significativas nos valores de absorvância (figura 33A), nem nas contagens parasitárias (figuras 33B e C).

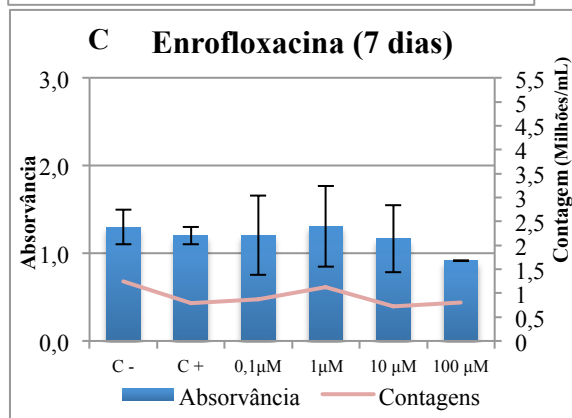
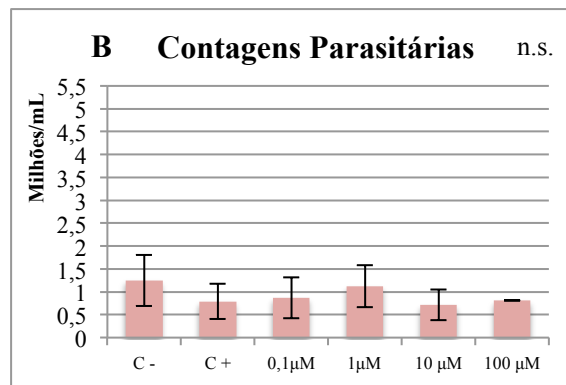
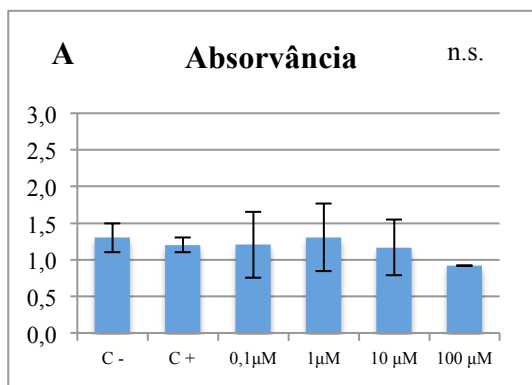


Figura 33: Estatística descritiva dos valores de absorvância (A), das contagens parasitárias (B) e sobreposição dos dois parâmetros (C) nos ensaios de sete dias com enrofloxacina.

6. FLEROXACINA – Segunda Geração

No ensaio de três dias, os valores médios de absorvância nas culturas tratadas com fleroxacina foram estatisticamente significativos ($p \leq 0,01$), tendo a concentração de 100 μM expressado um efeito pronunciado ($p \leq 0,05$) (figura 34A). Porém, as contagens não obtiveram diferenças significativas (figuras 34B e C).

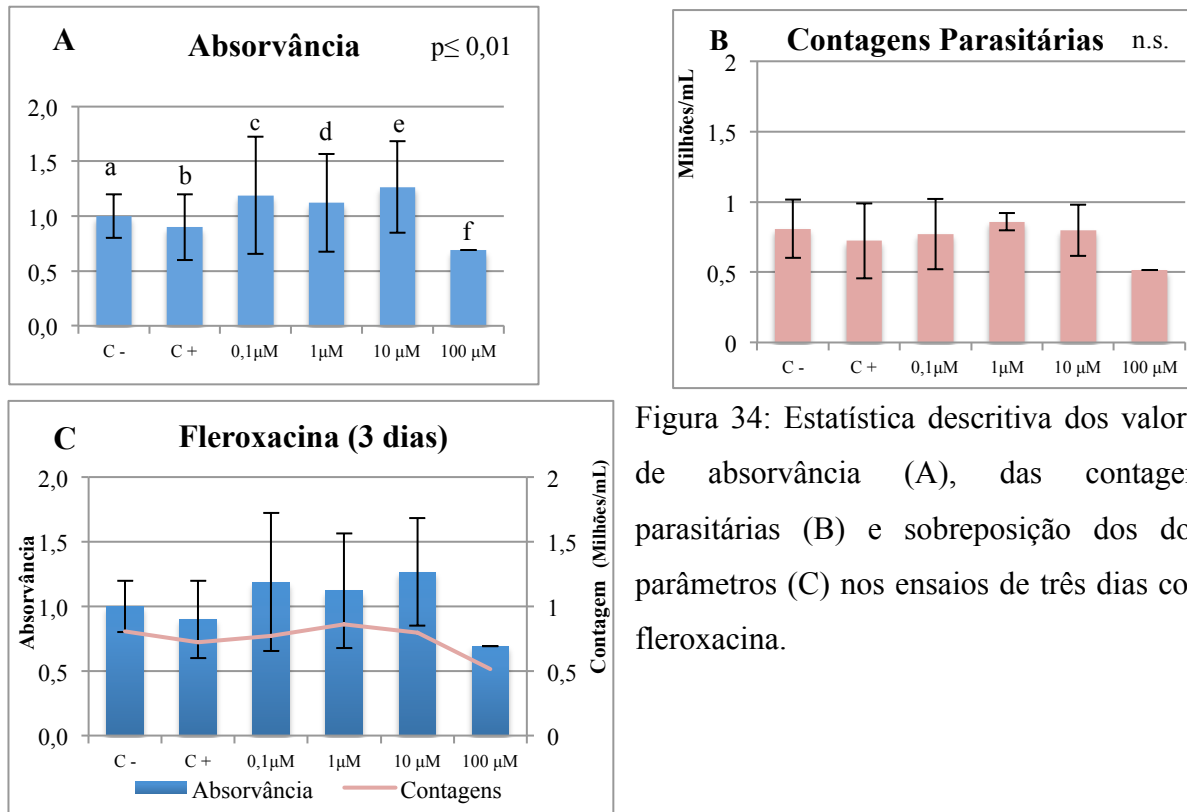


Figura 34: Estatística descritiva dos valores de absorvância (A), das contagens parasitárias (B) e sobreposição dos dois parâmetros (C) nos ensaios de três dias com fleroxacina.

No ensaio de sete dias, foram registradas diferenças significativas nos valores médios de absorvância ($p \leq 0,01$), com um efeito considerável à concentração de 100 μM ($p \leq 0,05$) (figura 35A). As contagens parasitárias não mostraram diferenças estatisticamente significativas (figuras 35B e C).

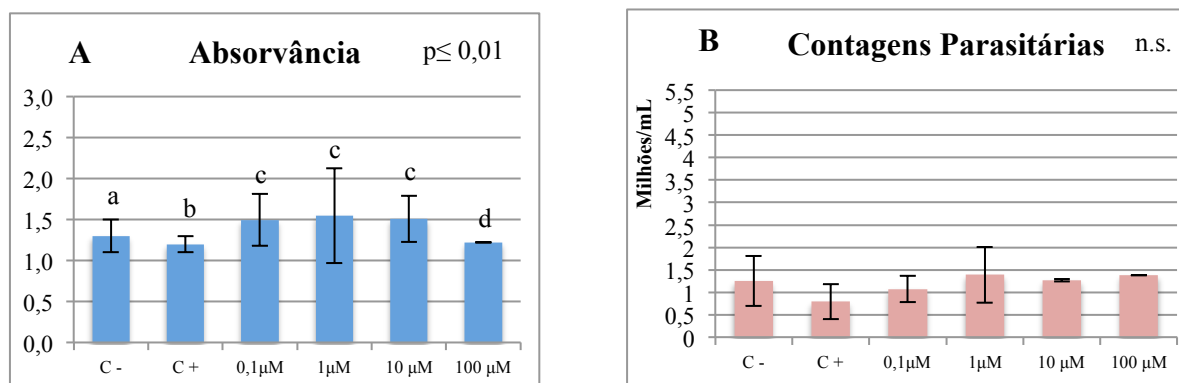


Figura 35: Estatística descritiva dos valores de absorvância (A), das contagens parasitárias (B) e sobreposição dos dois parâmetros (C) nos ensaios de sete dias com fleroxacina.

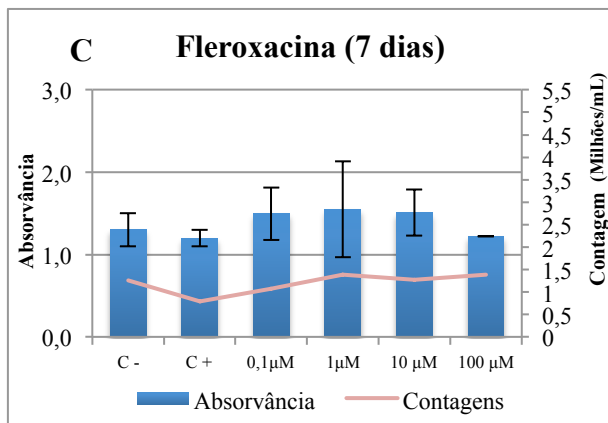


Figura 35: (continuação).

7. LOMEFLOXACINA – Segunda Geração

No ensaio de três dias, os valores de absorvância nas culturas tratadas com lomefloxacina demonstraram diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,01$), tendo sido revelado um efeito expressivo à concentração de 100 μM ($p \leq 0,05$) (figura 36A). No que toca às contagens parasitárias, não foram registadas diferenças que se possam considerar significativas (figuras 36B e C).

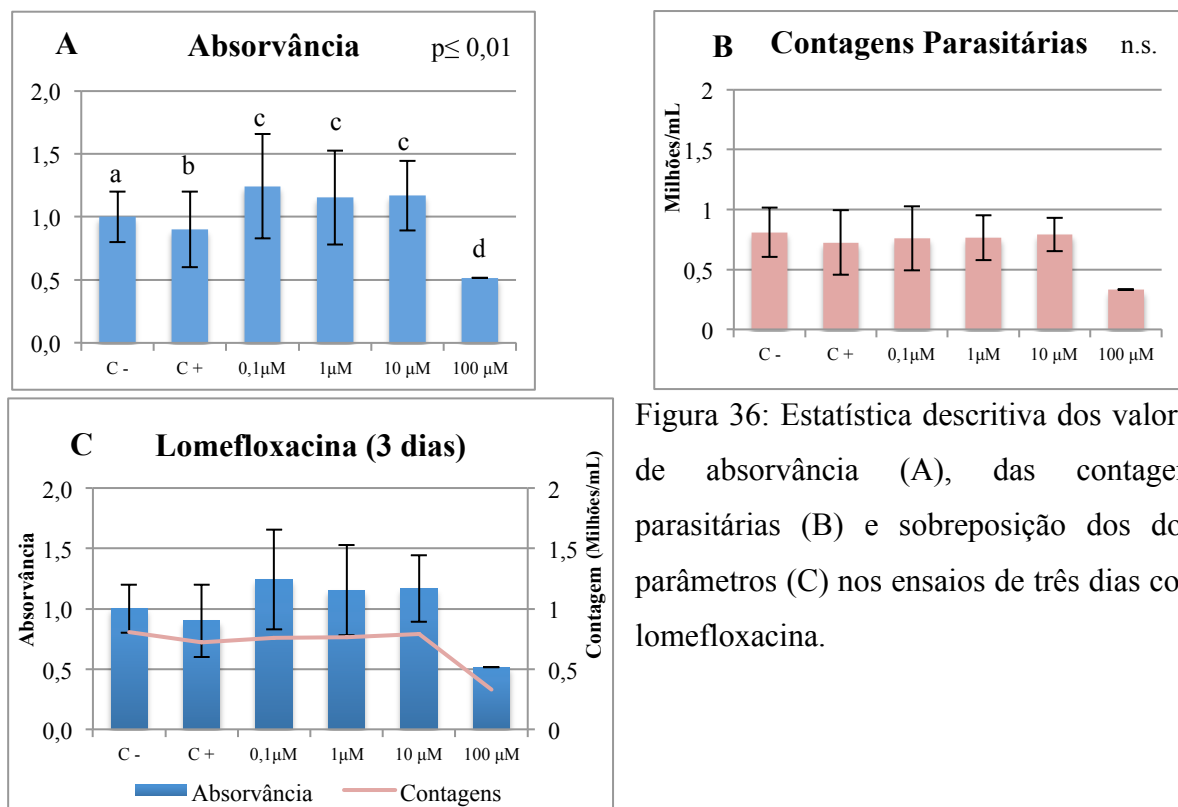


Figura 36: Estatística descritiva dos valores de absorvância (A), das contagens parasitárias (B) e sobreposição dos dois parâmetros (C) nos ensaios de três dias com lomefloxacina.

Aos sete dias, também obtiveram diferenças significativas nos valores de absorvância ($p \leq 0,01$) (figura 37A). As contagens registadas não mostraram diferenças estatisticamente evidentes (figuras 37B e C).

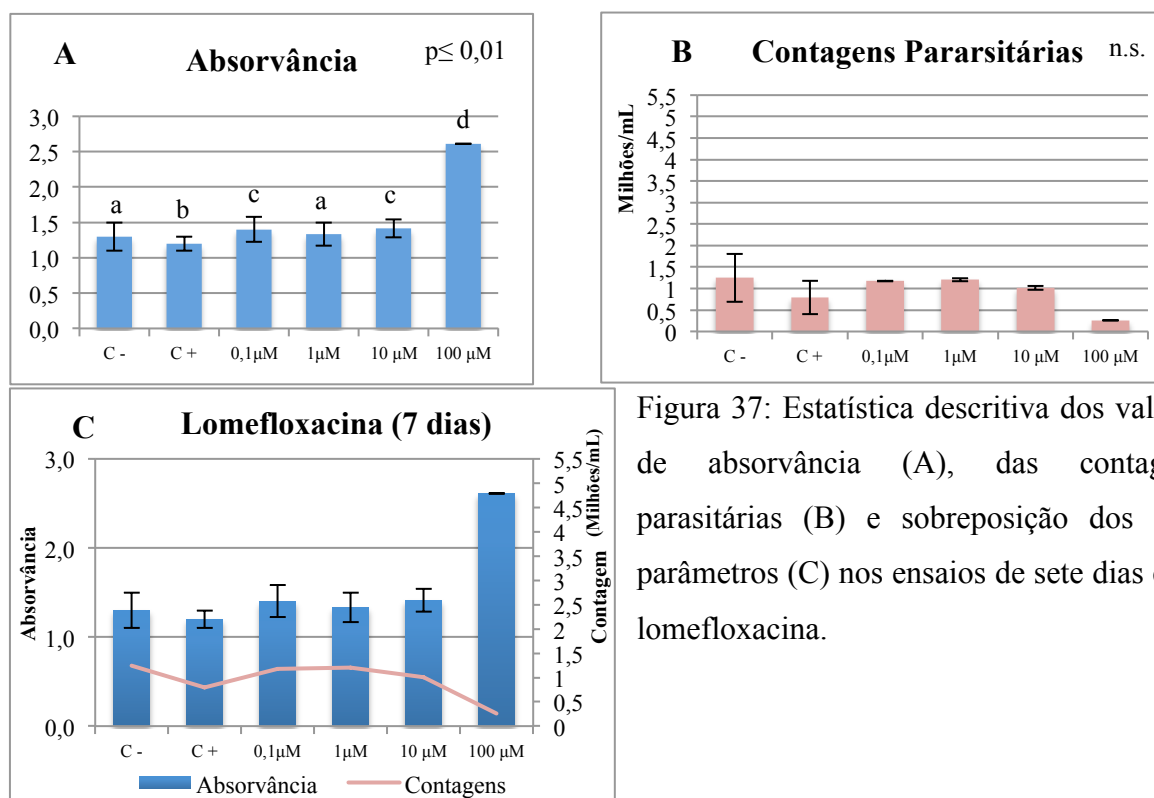


Figura 37: Estatística descritiva dos valores de absorvância (A), das contagens parasitárias (B) e sobreposição dos dois parâmetros (C) nos ensaios de sete dias com lomefloxacina.

8. BALOFLOXACINA – Terceira Geração

No ensaio de três dias, as diferenças entre os valores de absorvância obtidos nas culturas tratadas com balofloxacina foram estatisticamente significativos ($p \leq 0,01$). A concentração de 1 μ M demonstrou um efeito evidente ($p \leq 0,05$), em comparação ao controle positivo (cultura tratada com antimoniato de meglumina) (figura 38A). As contagens efetuadas não obtiveram diferenças significativas (figura 38B), contudo apresentaram alguma proporcionalidade relativamente aos valores de absorvância registados (figura 38C).

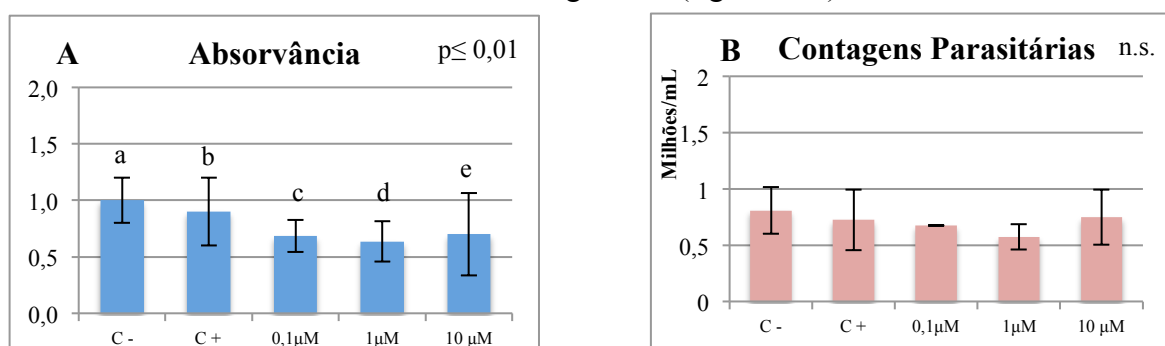


Figura 38: Estatística descritiva dos valores de absorvância (A), das contagens parasitárias (B) e sobreposição dos dois parâmetros (C) nos ensaios de três dias com balofloxacina.

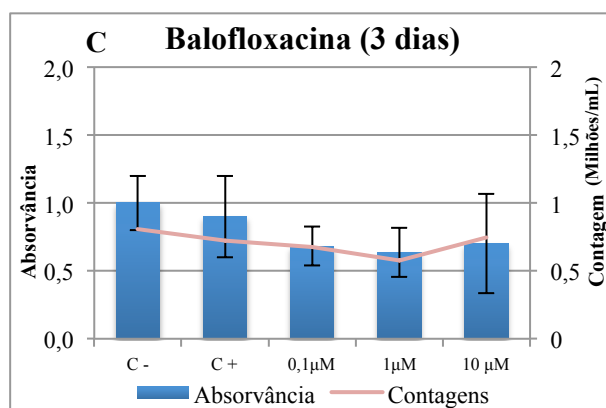


Figura 38: (continuação).

No ensaio de sete dias, as diferenças entre os valores de absorvância das culturas tratadas com balofloxacin foram estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$), tendo a concentração de 0,1 µM registado um efeito significativo ($p \leq 0,05$) relativamente ao controlo positivo (figura 39A). Em paralelo, as contagens parasitárias realizadas não demonstraram diferenças relevantes (figuras 39B e C).

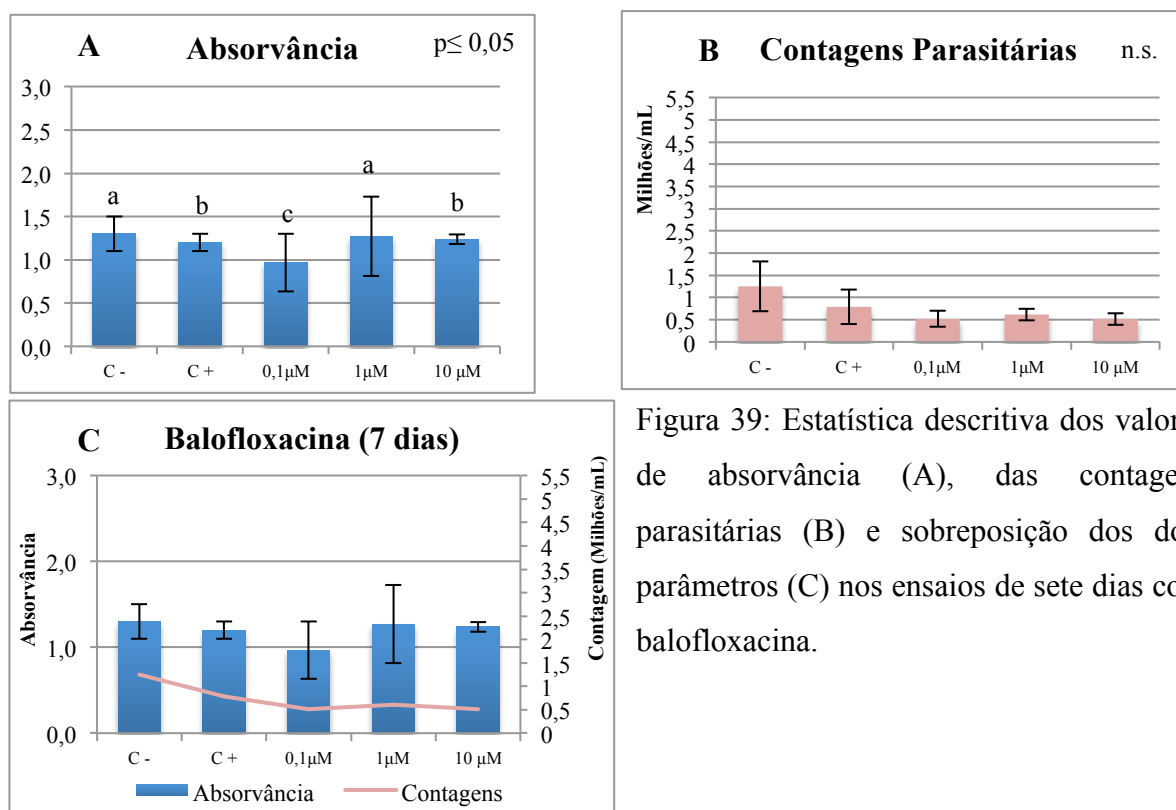


Figura 39: Estatística descritiva dos valores de absorvância (A), das contagens parasitárias (B) e sobreposição dos dois parâmetros (C) nos ensaios de sete dias com balofloxacin.

9. DANOFLORACINA – Terceira Geração

No ensaio de três dias, as diferenças dos valores de absorvância das culturas tratadas com danofloxacin foram estatisticamente significativas ($p \leq 0,01$), com um efeito relevante às concentrações de $0,1 \mu\text{M}$ ($p \leq 0,05$) e de $100 \mu\text{M}$ ($p \leq 0,01$) (figura 40A). As contagens parasitárias não demonstraram diferenças significativas (figuras 40B e C).

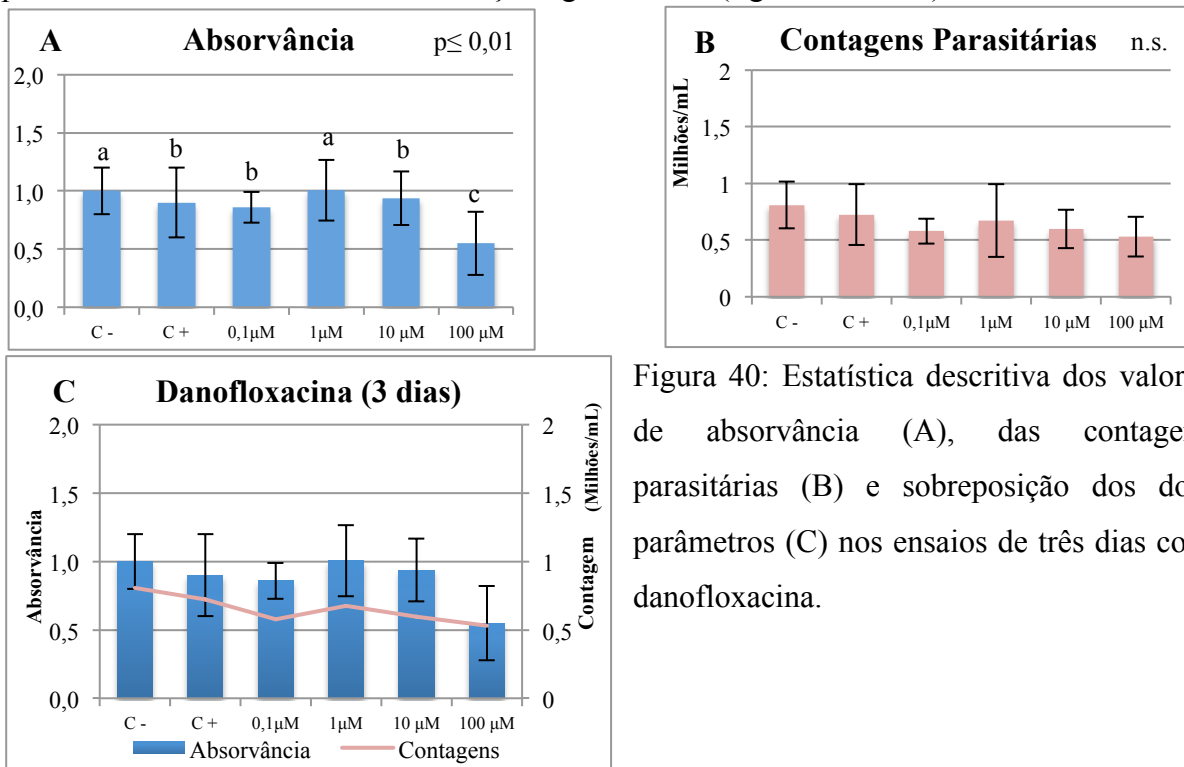


Figura 40: Estatística descritiva dos valores de absorvância (A), das contagens parasitárias (B) e sobreposição dos dois parâmetros (C) nos ensaios de três dias com danofloxacin.

No ensaio de sete dias, as culturas tratadas com danofloxacin também apresentaram diferenças significativas nos valores de absorvância ($p \leq 0,01$), tendo sido alcançado um efeito expressivo à concentração de $100 \mu\text{M}$ ($p \leq 0,01$) (figura 41A). As diferenças registradas nas contagens parasitárias não foram estatisticamente significativas (figuras 41B e C).

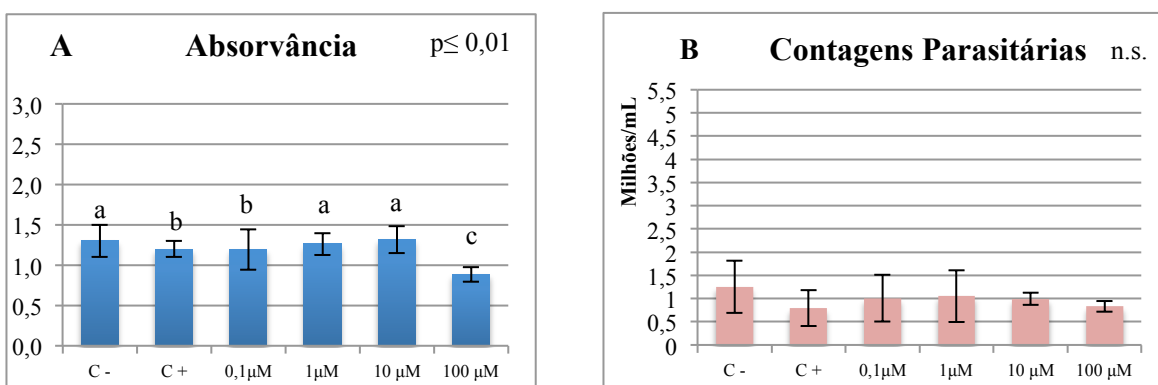


Figura 41: Estatística descritiva dos valores de absorvância (A), das contagens parasitárias (B) e sobreposição dos dois parâmetros (C) nos ensaios de sete dias com danofloxacin.

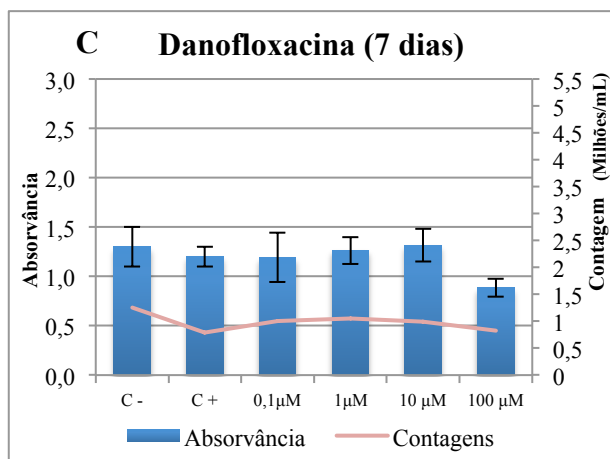


Figura 41: (continuação).

10. GREPAFLOXACINA – Terceira Geração

No ensaio de três dias, as diferenças entre os valores de absorvância nas culturas tratadas com grepafloxacin foram estatisticamente significativas ($p \leq 0,01$). Comparativamente ao controle positivo (cultura tratada com antimoniato de meglumina), foi evidenciado um efeito significativo às concentrações de 0,1 μM ($p \leq 0,05$); 10 μM ($p \leq 0,05$) e 100 μM ($p \leq 0,05$). Paralelamente, as contagens não obtiveram diferenças significativas (figura 42B), apesar de se observar alguma proporcionalidade em relação aos valores de absorvância registrados (figura 42C).

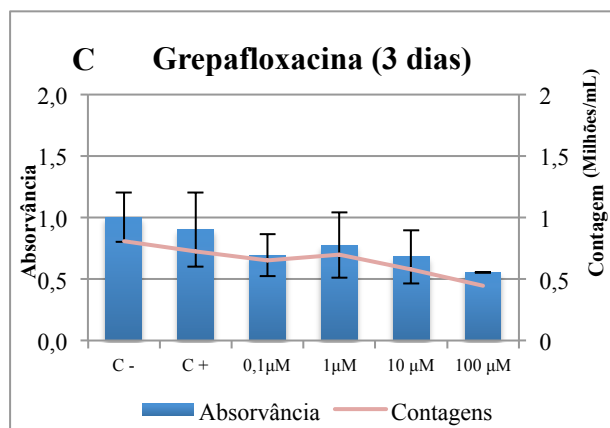
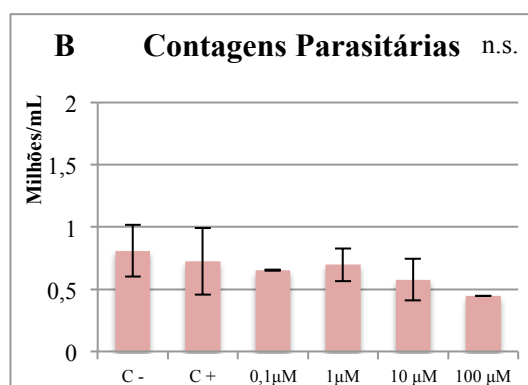
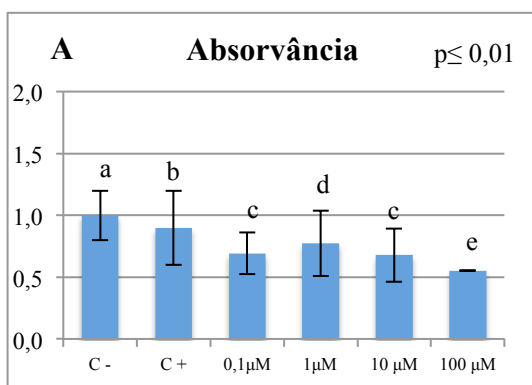


Figura 42: Estatística descritiva dos valores de absorvância (A), das contagens parasitárias (B) e sobreposição dos dois parâmetros (C) nos ensaios de três dias com grepafloxacin.

No ensaio de sete dias, as diferenças entre os valores de absorvância também foram significativas ($p \leq 0,01$), obtendo-se efeitos pronunciados às concentrações de $0,1 \mu\text{M}$ ($p \leq 0,01$) e $100 \mu\text{M}$ ($p \leq 0,01$) (figura 43A). Relativamente às contagens, as diferenças obtidas não foram estatisticamente significativas (figuras 43B e C).

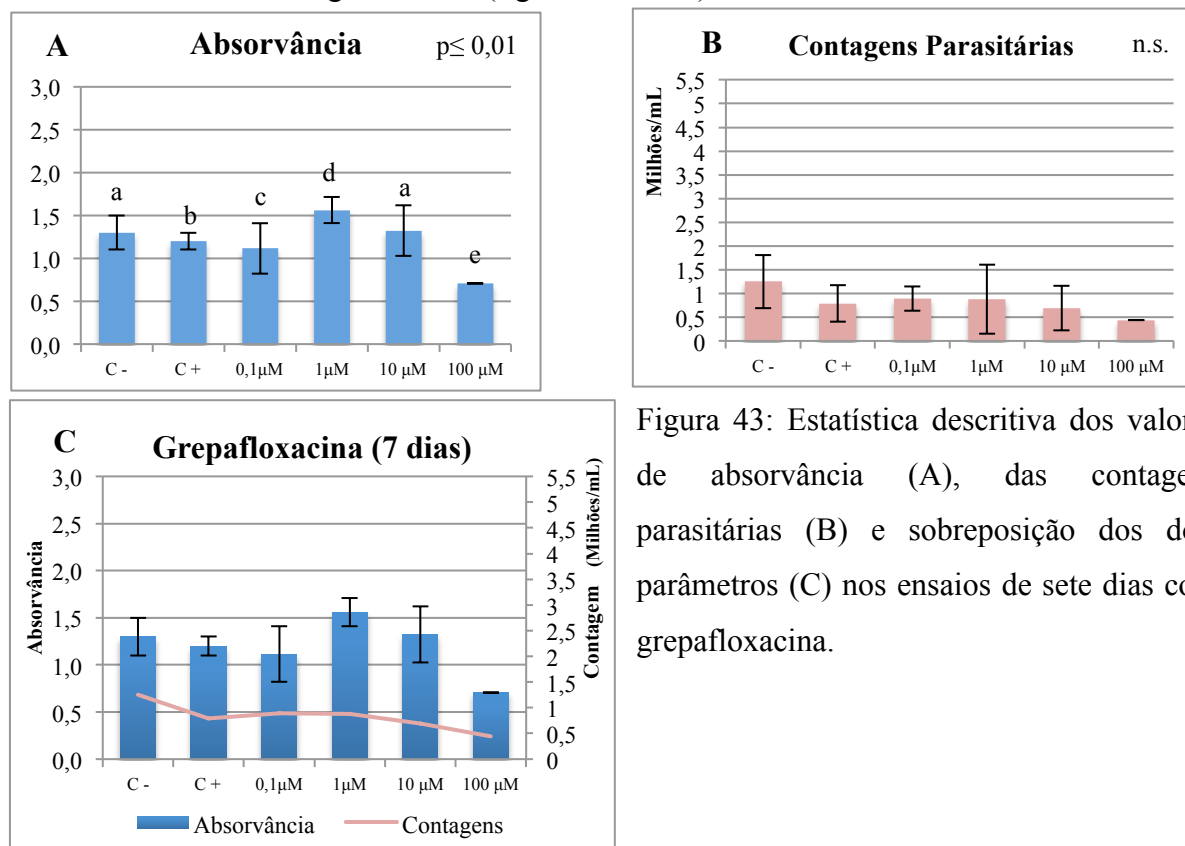


Figura 43: Estatística descritiva dos valores de absorvância (A), das contagens parasitárias (B) e sobreposição dos dois parâmetros (C) nos ensaios de sete dias com grepafloxacina.

11. LEVOFLOXACINA – Terceira Geração

No ensaio de três dias, as culturas tratadas com levofloxacin apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os valores de absorvância ($p \leq 0,01$) (figura 44A). Foi registado um efeito significativo à concentração de $10 \mu\text{M}$ ($p \leq 0,05$), quando comparado com controlo positivo (cultura tratada com antimoniato de meglumina). As contagens parasitárias não mostraram diferenças significativas (figuras 44B e C).

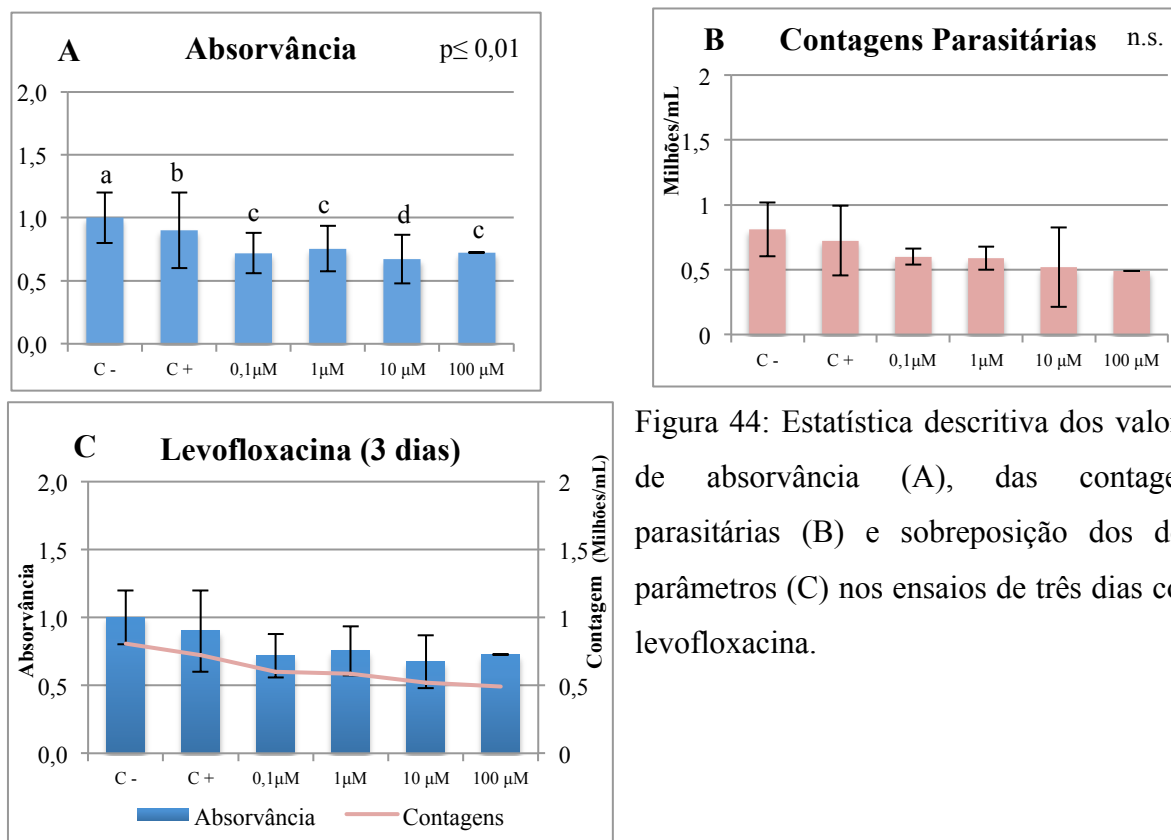


Figura 44: Estatística descritiva dos valores de absorvância (A), das contagens parasitárias (B) e sobreposição dos dois parâmetros (C) nos ensaios de três dias com levofloxacina.

No ensaio de sete dias, os valores de absorvância das culturas expostas à levofloxacina também apresentaram diferenças significativas ($p \leq 0,01$) (figura 45A), tendo sido obtidos efeitos expressivos às concentrações de 0,1 μ M ($p \leq 0,05$) e 100 μ M ($p \leq 0,05$). As contagens realizadas não registraram diferenças estatisticamente significativas (figuras 45B e C).

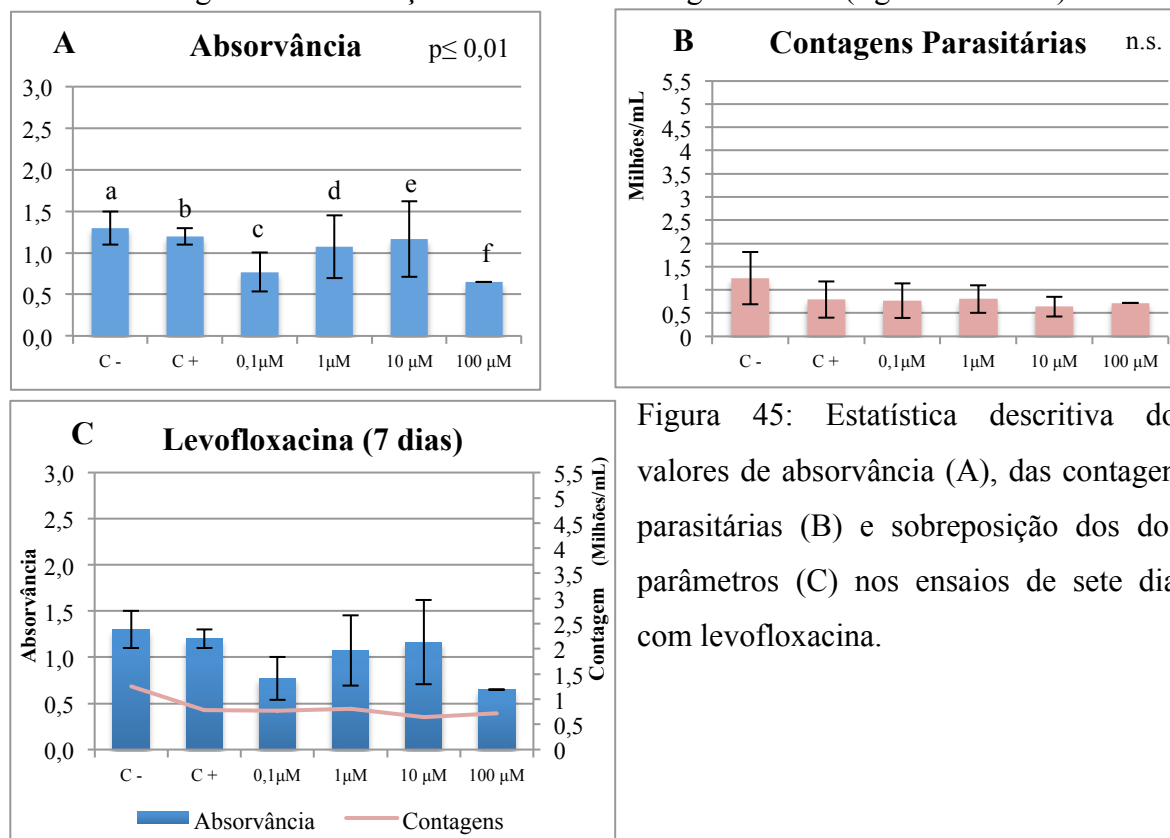


Figura 45: Estatística descritiva dos valores de absorvância (A), das contagens parasitárias (B) e sobreposição dos dois parâmetros (C) nos ensaios de sete dias com levofloxacin.

12. MARBOFLOXACINA – Terceira Geração

No ensaio de três dias, os valores de absorvância das culturas que receberam marbofloxacina mostraram diferenças significativas ($p \leq 0,01$), com um efeito pronunciado à concentração de 100 μM foram ($p \leq 0,01$) (figura 46A). Relativamente às contagens, as diferenças apresentadas não foram estatisticamente significativas (figuras 46B e C).

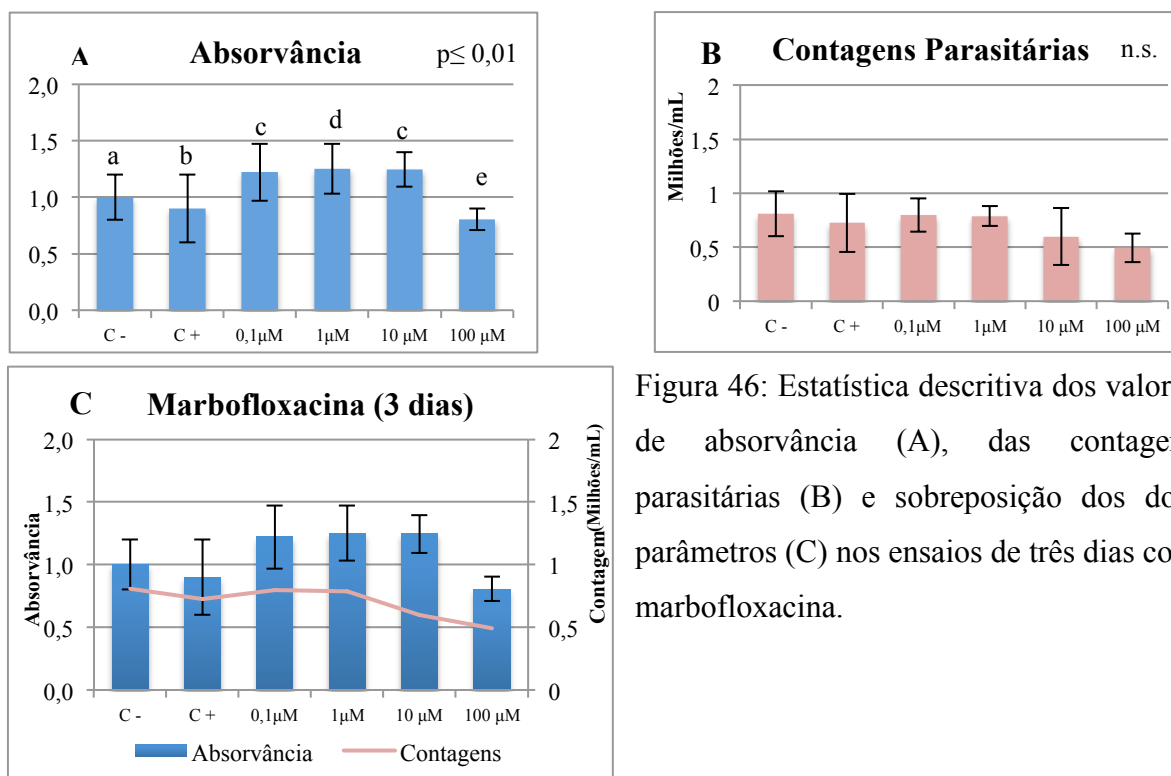


Figura 46: Estatística descritiva dos valores de absorvância (A), das contagens parasitárias (B) e sobreposição dos dois parâmetros (C) nos ensaios de três dias com marbofloxacina.

No ensaio de sete dias, os valores de absorvância também demonstraram diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,01$), manifestando-se um efeito relevante à concentração de 100 μM ($p \leq 0,05$) (figura 47A). As diferenças entre as contagens parasitárias não foram significativas (figuras 47B e C).

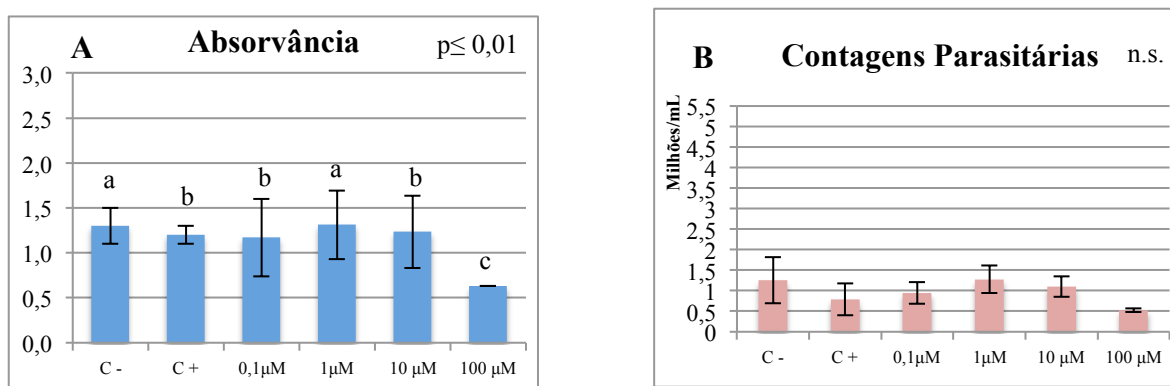


Figura 47: Estatística descritiva dos valores de absorvância (A), das contagens parasitárias (B) e sobreposição dos dois parâmetros (C) nos ensaios de sete dias com marbofloxacina.

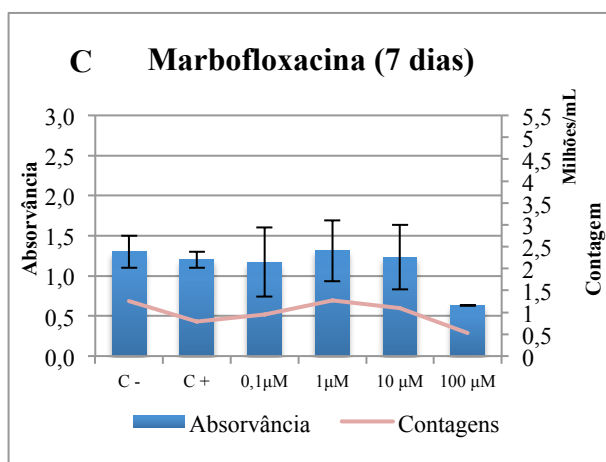


Figura 47: (continuação).

13. BESIFLOXACINA – Quarta Geração

No ensaio de três dias, os valores de absorvância das culturas parasitárias tratadas com besifloxacina revelaram diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,01$), com um efeito evidente à concentração de 100 μM ($p \leq 0,05$) (figura 48A). As contagens parasitárias não registraram diferenças significativas (figuras 48B e C).

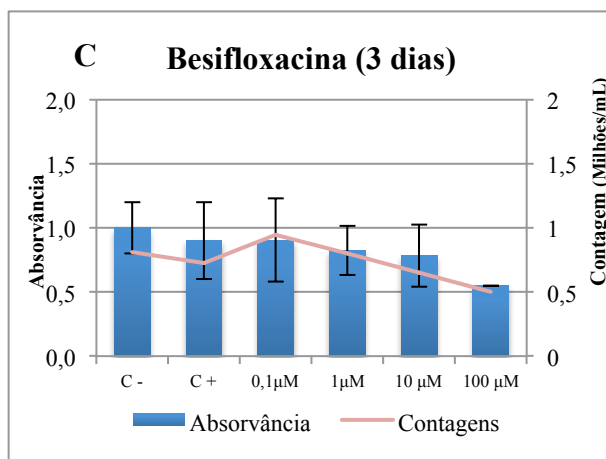
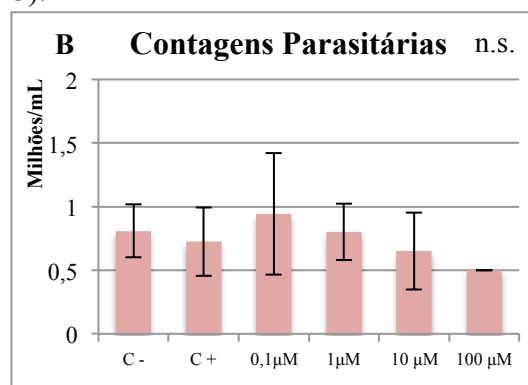
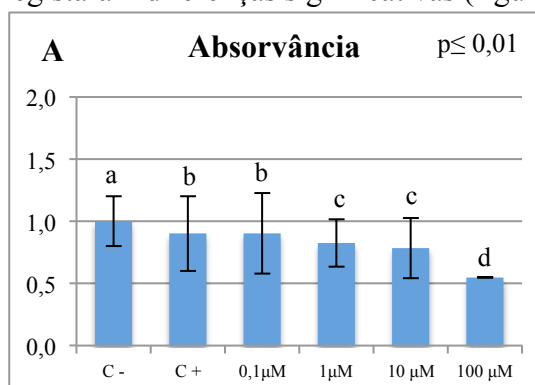


Figura 48: Estatística descritiva dos valores de absorvância (A), das contagens parasitárias (B) e sobreposição dos dois parâmetros (C) nos ensaios de três dias com besifloxacina.

No ensaio de sete dias, as diferenças entre os valores de absorvância das culturas que foram tratadas com besifloxacina foram significativas ($p \leq 0,01$), tendo sido observado um efeito expressivo à concentração de 100 μM ($p \leq 0,01$) (figura 49A). Os valores das contagens realizadas não obtiveram diferenças estatisticamente relevantes (figuras 49B e C).

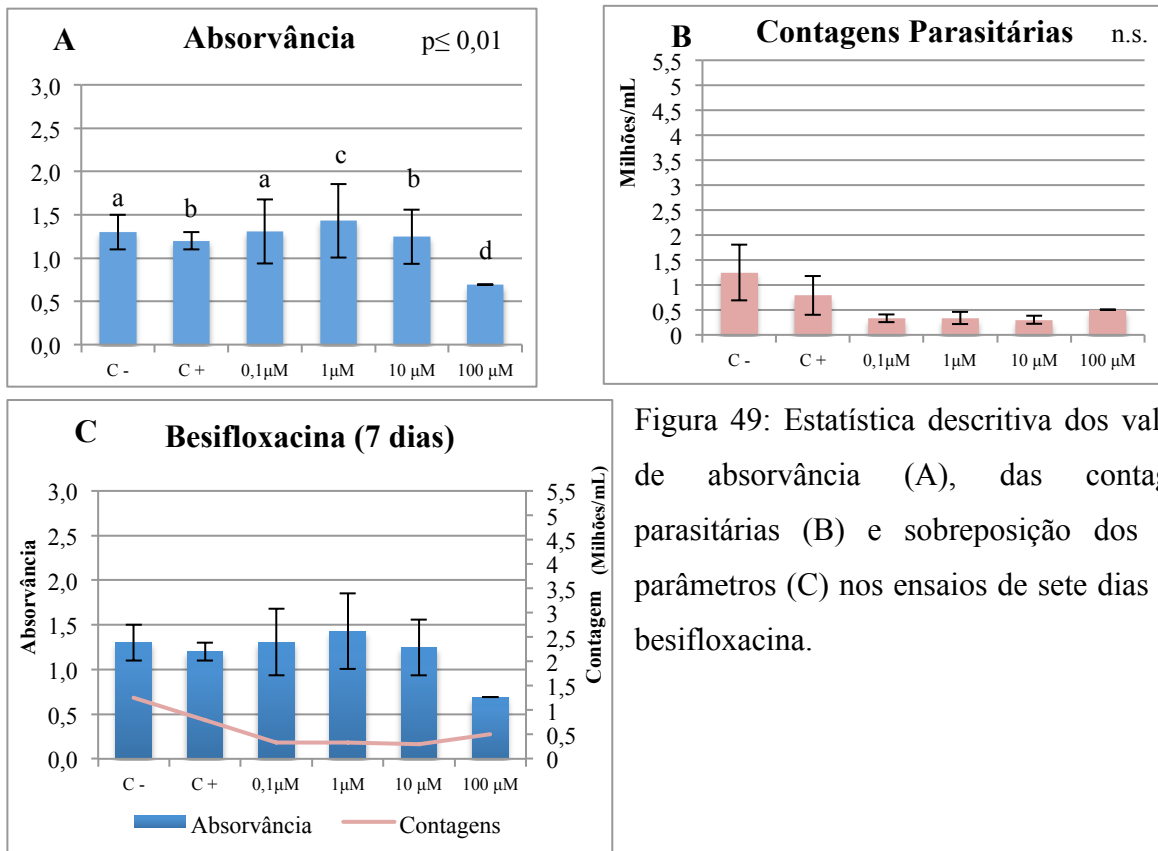


Figura 49: Estatística descritiva dos valores de absorvância (A), das contagens parasitárias (B) e sobreposição dos dois parâmetros (C) nos ensaios de sete dias com besifloxacina.

14. CLINAFLOXACINA – Quarta Geração

No ensaio de três dias, as diferenças entre os valores de absorvância das culturas expostas à clinafloxacin foram estatisticamente significativas ($p \leq 0,01$), com um efeito expressivo à concentração de 100 μM ($p \leq 0,05$) (figura 50A). As contagens parasitárias não apresentaram diferenças significativas (figuras 50B e C).

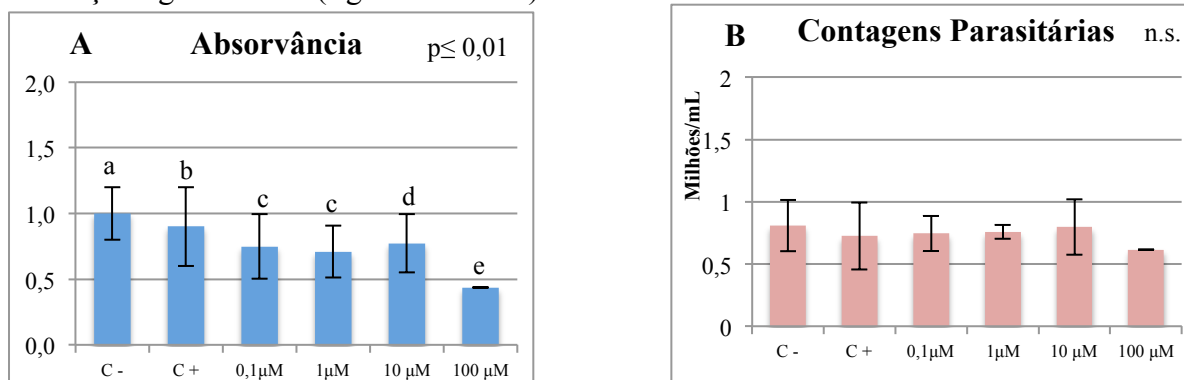


Figura 50: Estatística descritiva dos valores de absorvância (A), das contagens parasitárias (B) e sobreposição dos dois parâmetros (C) nos ensaios de três dias com clinafloxacin.

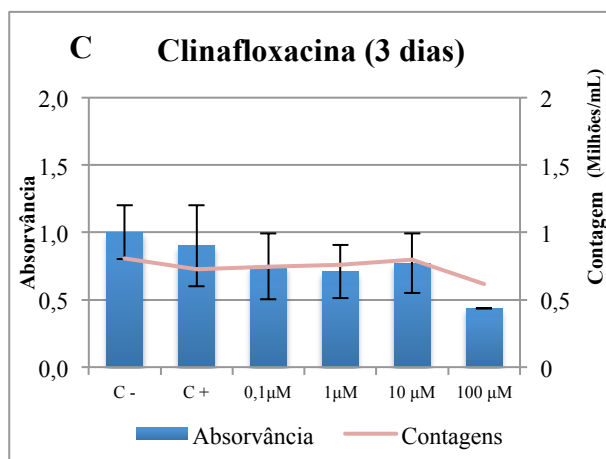


Figura 50: (continuação).

No ensaio de sete dias, as diferenças entre os valores de absorvância também foram significativas ($p \leq 0,01$), manifestando-se um efeito relevante à concentração de 100 µM ($p \leq 0,01$) (figura 51A). As contagens realizadas não registraram diferenças significativas (figuras 51B e C).

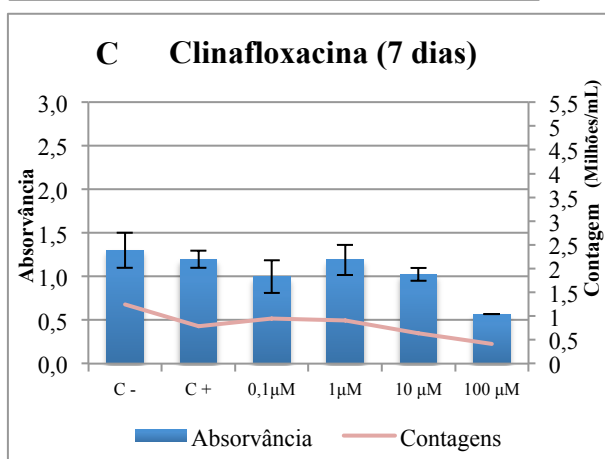
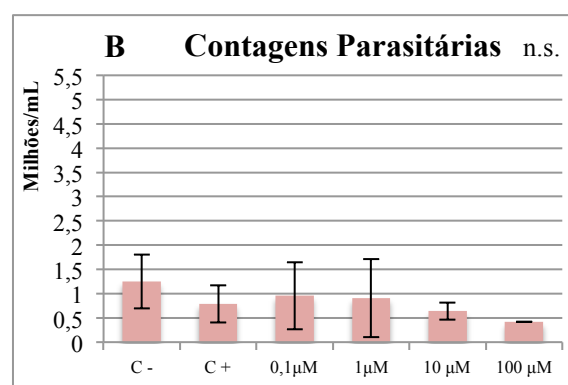
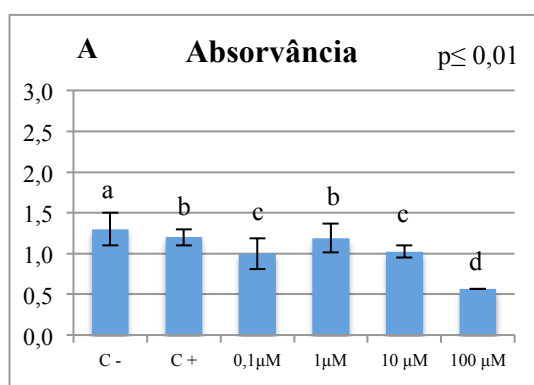


Figura 51: Estatística descritiva dos valores de absorvância (A), das contagens parasitárias (B) e sobreposição dos dois parâmetros (C) nos ensaios de sete dias com clinafloxacin.

15. GARENOXACINA – Quarta Geração

No ensaio de três dias, os valores de absorvância das culturas tratadas com garenoxacina obtiveram diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,01$), observando-se um efeito significativo à concentração de 100 μM ($p \leq 0,05$) (figura 52A). Paralelamente, as contagens parasitárias efetuadas não registraram diferenças estatisticamente relevantes (figuras 52B e C).

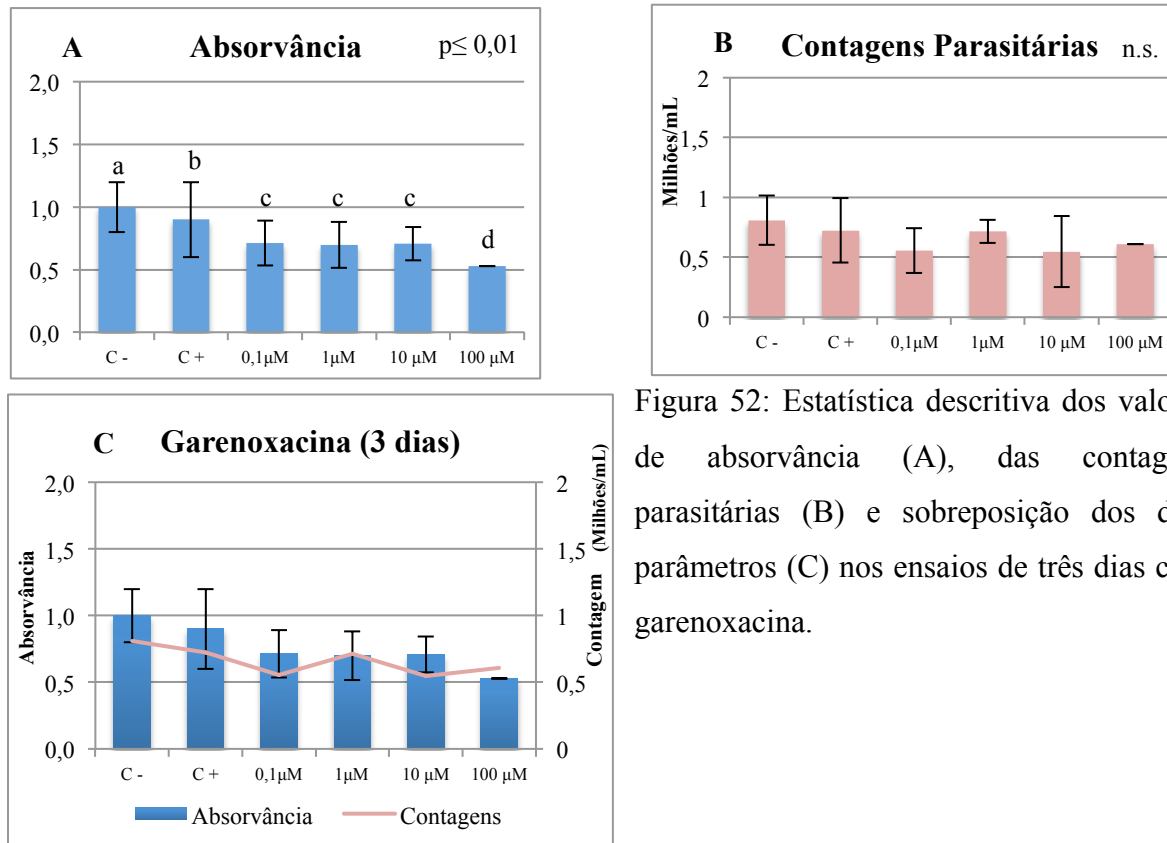


Figura 52: Estatística descritiva dos valores de absorvância (A), das contagens parasitárias (B) e sobreposição dos dois parâmetros (C) nos ensaios de três dias com garenoxacina.

No ensaio de sete dias, os valores de absorvância também apresentaram diferenças significativas ($p \leq 0,01$), com um efeito expressivo à concentração de 100 μM ($p \leq 0,01$) (figura 53A). As contagens realizadas não registraram diferenças significativas (figura 53B), apesar de se observar alguma proporcionalidade relativamente aos valores registados de conversão de MTS (figura 53C).

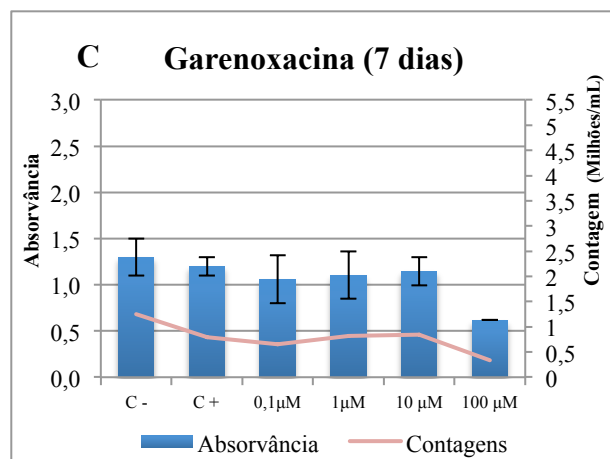
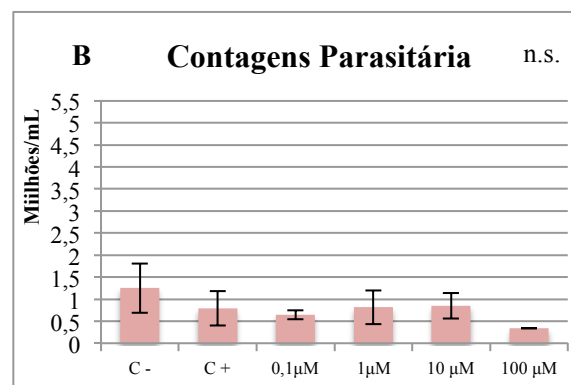
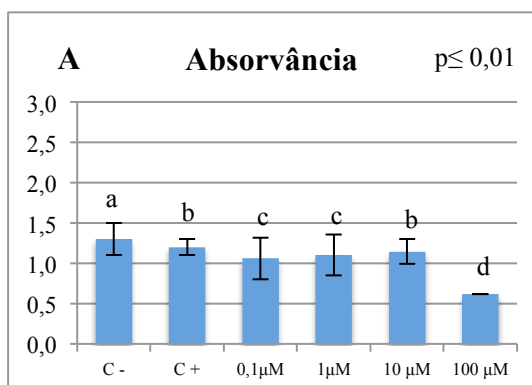


Figura 53: Estatística descritiva dos valores de absorvância (A), das contagens parasitárias (B) e sobreposição dos dois parâmetros (C) nos ensaios de sete dias com garenoxacina.

16. ALTERAÇÕES MORFO-FUNCIONAIS

Observaram-se ao microscópio ótico alterações morfológicas e de motilidade em todas as culturas tratadas com fluoroquinolonas, nas diferentes concentrações testadas. Muitas das formas promastigota presentes nas culturas expostas a tratamento apresentavam uma forma globosa, núcleo picnótico, citoplasma vacuolar/granuloso e, frequentemente, um flagelo curto ou ausente (figura 54B). Foi evidente uma notória redução da mobilidade, comparativamente aos parasitas não sujeitos a tratamentos, sendo os movimentos observados vibratórios circulares ou estacionários. No que diz respeito às rosetas de multiplicação nas culturas tratadas, estas apresentavam uma organização espacial anárquica, exibindo formas promastigota com diferentes morfologias e tamanhos (figura 55B e figuras 56A, B e C), relativamente às rosetas de multiplicação de culturas não tratadas (figura 55A).

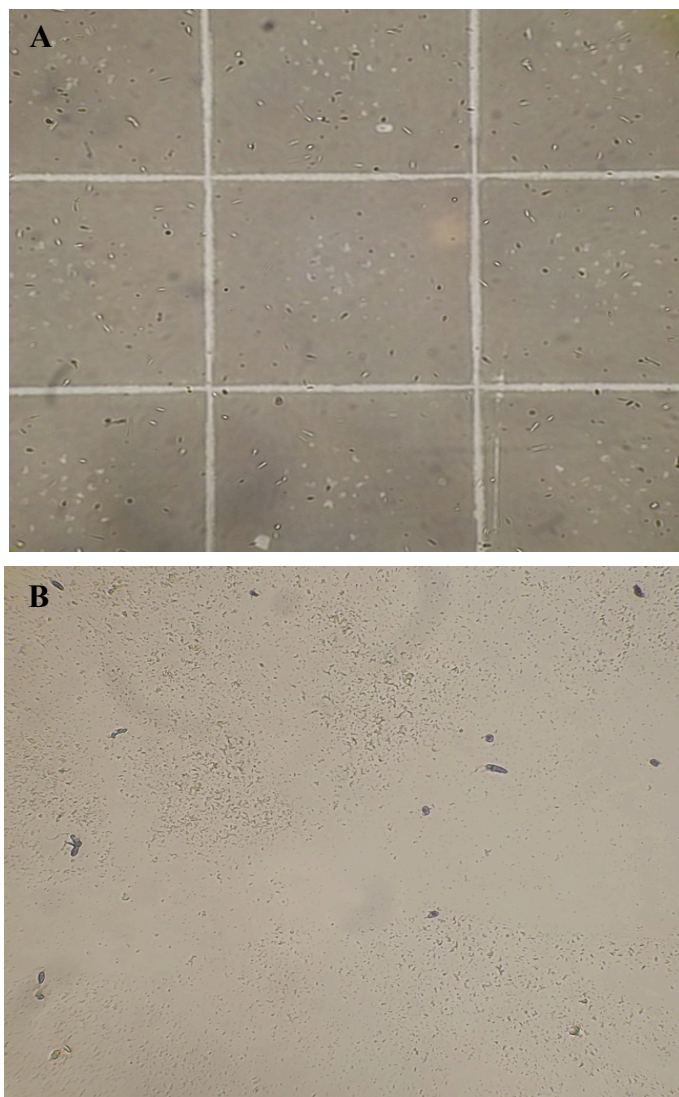


Figura 54: Aspetto de formas promastigota de *L. infantum* observadas ao microscópio ótico em cultura não tratada (A) — ampliação 200x — e em cultura exposta a balofloxacina (10 µM/mL) (B) — ampliação de 400x.

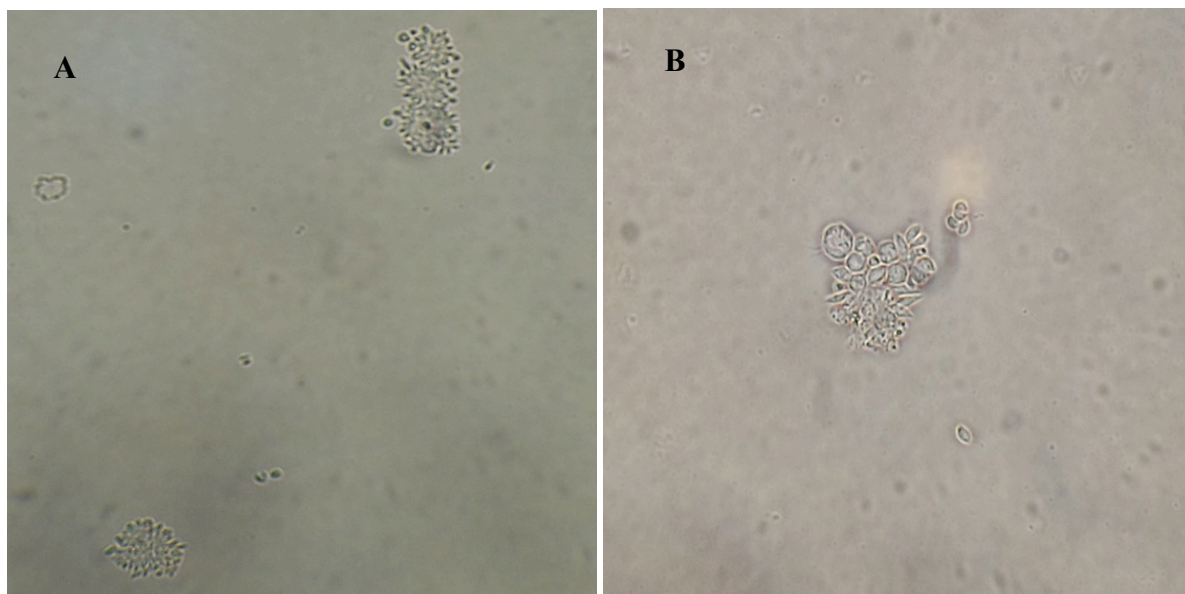


Figura 55: Conformação de rosetas de multiplicação de *L. infantum* em cultura não tratada (A) e em cultura exposta a levofloxacina (10 µM/mL) (B) — ampliação de 400x.



Figura 56: Alterações morfológicas observadas em culturas tratadas com fluoroquinolonas: flagelo duplo (A), aspeto dismórfico (B) e formato vacuolar do corpo (C) — coloração Giemsa, ampliação 1000x.

As fluoroquinolonas têm sido descritas como uma possível arma terapêutica para agentes parasitários intracelulares como *L. infantum*. Além do seu efeito imunomodulador (Rougier et al., 2008), possuem uma ação bactericida e apresentam um bom poder de penetração nos tecidos e nas células (Appelbaum & Hunter, 2000).

O ácido nalidíxico, que ao contrário das restantes moléculas não possui o átomo de flúor, mostrou algum efeito apenas no tratamento de sete dias, à concentração de 10 μM ($p \leq 0,01$) e de 100 μM ($p \leq 0,01$).

A ciprofloxacina no ensaio de três dias mostrou algum efeito anti-leishmania na maior concentração testada (100 μM) ($p \leq 0,05$). Nos tratamentos de sete dias, apresentou um efeito significativo à menor (0,1 μM) ($p \leq 0,01$) e à maior concentração (100 μM) ($p \leq 0,05$). Por outro lado, as contagens parasitárias na maioria dos grupos de tratamento também foram mais elevadas do que na cultura tratada com antimoniato de meglumina. No entanto, na concentração de 100 μM foram contados menos protozoários do que no controlo positivo. Dado que foi nesta concentração que ocorreu maior absorvância média, especula-se que poderá ter havido morte parasitária e libertação de enzimas e outros componentes celulares para o meio que, provavelmente, terão promovido a conversão do MTS.

A difloxacina alcançou um efeito significativo apenas aos três dias de tratamento, na concentração de 100 μM ($p \leq 0,05$). As contagens ao dia sete revelaram-se equilibradas, presumivelmente, pelos protozoários terem adquirido alguma tolerância *in vitro* ao fármaco.

A enoxacina aos três e sete dias não demonstrou citotoxicidade significativa, exceto a concentração de 100 μM , apresentando uma significância próxima nos dois ensaios ($p \leq 0,05$). No tratamento com a enrofloxacina, a citotoxicidade foi significativa apenas aos três dias, na concentração de 100 μM ($p \leq 0,05$). No entanto, todas as contagens foram inferiores às dos controlos.

A fleroxacina nos ensaios de três e de sete dias demonstrou efeito citotóxico, à concentração de 100 μM ($p \leq 0,05$). Ao fim de sete dias de tratamento, todas as culturas tratadas mostravam valores de absorvância próximos do controlo negativo, provavelmente, pela resistência *in vitro* dos parasitas a esta molécula.

A lomefloxacina manifestou citotoxicidade significativa ao final de três dias de tratamento, à concentração de 100 μM ($p \leq 0,05$). Aos sete dias, a média da absorvância registada nas culturas expostas a 100 μM ultrapassa o que seria espectável tendo em conta a contagem. Este fenómeno pode dever-se à morte celular em grandes proporções com a libertação de enzimas que contribuíram na conversão do MTS.

No tratamento com a balofloxacin no ensaio de três dias registou um efeito significativo, à concentração de 1 μM ($p \leq 0,05$). Ao fim dos sete dias, obteve um efeito citotóxico significativo à concentração de 0,1 μM ($p \leq 0,05$).

As contagens obtidas após o tratamento de três dias com a danofloxacin foram inferiores aos controlos, nas várias concentrações testadas, no entanto só as concentrações de 0,1 μM ($p \leq 0,05$) e de 100 μM ($p \leq 0,01$) registaram efeitos significativos. Ao final dos sete dias, apenas a concentração de 100 μM ($p \leq 0,01$) manteve a sua eficácia.

A grepafloxacin após os três dias de tratamento mostrou propriedades anti-leishmania estatisticamente significativas *in vitro*, às concentrações de 0,1 μM ($p \leq 0,05$); 10 μM ($p \leq 0,05$) e de 100 μM ($p \leq 0,05$). Após os sete dias de tratamento, foi mantida uma eficácia significativa às concentrações de 0,1 μM ($p \leq 0,01$) e de 100 μM ($p \leq 0,01$).

A exposição à levofloxacin durante três dias alcançou um efeito significativo à concentração de 10 μM ($p \leq 0,05$). Aos sete dias de exposição, os efeitos citotóxicos significativos foram obtidos às concentrações de 0,1 μM ($p \leq 0,05$) e de 100 μM ($p \leq 0,05$).

Nos tratamentos com a marbofloxacin, ao fim de três e sete dias foi demonstrado um efeito significativo à concentração de 100 μM , que aos sete dias teve uma menor significância ($p \leq 0,05$) do que aos três dias ($p \leq 0,01$).

A besifloxacin teve uma eficácia significativa nos ensaios de três e sete dias, à concentração de 100 μM , sendo que a sua significância sofreu um aumento dos três dias ($p \leq 0,05$) para os sete dias de tratamento ($p \leq 0,01$). De salientar que no ensaio de sete dias as contagens foram notoriamente menores nas várias concentrações do que em qualquer um dos controlos, o que sugere que poderá ter ocorrido morte celular e, consecutivamente, saída de enzimas e outros componentes celulares para o meio que, provavelmente, poderão ter convertido o MTS.

As culturas expostas à clinafloxacin ao fim de três e de sete dias obtiveram uma eficácia significativa, à concentração de 100 μM . A significância registada aos três dias ($p \leq 0,05$) foi menor do que aos sete dias ($p \leq 0,01$).

O mesmo ocorreu nas culturas tratadas com garenoxacin, que ao fim de três e de sete dias tiveram efeitos significativos à concentração de 100 μM , sendo que a significância sofreu um aumento dos três dias ($p \leq 0,05$) para os sete dias de tratamento ($p \leq 0,01$).

Resumindo, as várias moléculas testadas e pertencentes à segunda geração – ciprofloxacin, difloxacin, enoxacin, enrofloxacin, fleroxacin e lomefloxacin – apenas mostraram alguma eficácia na concentração mais alta (100 μM). Esta ocorrência pode encontrar justificação pelo facto do espectro de ação deste grupo de fármacos contemplar sobretudo bactérias Gram-negativas. Dado que a LiTOP II é filogeneticamente mais próxima da sua

homóloga codificada pelas bactérias Gram-positivas, é plausível que o efeito inibitório anti-leishmania se verifique de forma mais marcada nas fluoroquinolonas que apresentam maior afinidade nas bactérias Gram-positivas (fluoroquinolonas de terceira e de quarta geração). De facto, as várias moléculas testadas de terceira (balofloxacin, danofloxacin, grepafloxacin, levofloxacin e marbofloxacin) e de quarta geração (besifloxacin, cinafloxacin e garenoxacin) demonstraram efeitos inibitórios mais significativos mesmo em concentrações mais baixas e até em tratamentos mais curtos.

Estes resultados estão parcialmente de acordo com os dados publicados por Vouldoukis *et al* (2006), onde foi verificada a atividade leishmanicida da marbofloxacin (terceira geração) *in vitro* sendo que, após o tratamento, os macrófagos adquiriram atividade leishmanicida por aumento da expressão de TNF- α que atua em sinergia com o IFN- γ para a eliminação das formas amastigota via óxido nítrico. Por outro lado, Farca *et al.* (2012) mostrou ser benéfica a associação entre a marbofloxacin e a miltefosina com o alopurinol, o que corrobora as observações *in vivo* que parecem sugerir uma sobrevivência maior dos cães com Leishmaniose tratados com esta combinação. Bianciardi *et al* (2004) publicou a ausência de um efeito leishmanicida em culturas de promastigotas quando expostas a enrofloxacin, em parte de acordo com os resultados agora publicados.

As alterações morfológicas e de motilidade observadas nas formas promastigota por microscopia ótica foram encontradas após a incubação com várias fluoroquinolonas a diferentes concentrações. Estas modificações foram mais evidentes nas concentrações maiores, onde os parasitas apresentavam uma conformação arredondada, cromatina condensada, flagelo dismórfico e mobilidade alterada. Também as rosetas de multiplicação revelavam formas atípicas e irregulares, presumivelmente, uma consequência da inibição da atividade enzimática da LiTOP II. Atendendo aos resultados obtidos, as fluoroquinolonas devem induzir a formação irreversível de complexos de clivagem que, ao acumularem-se, impedem a replicação do ADN parasitário. Com efeito, Zuma, Cavalcanti, Maia, Souza e Motta (2010) registaram alterações semelhantes em *T. cruzi*, após incubação com inibidores da topoisomerase II.

Os resultados deste trabalho experimental indicaram que existe um efeito inibitório *in vitro* de algumas moléculas da família das fluoroquinolonas sobre formas promastigota de *L. infantum*. As fluoroquinolonas de segunda geração, apenas mostraram alguma eficácia à maior concentração. As moléculas de terceira geração demonstraram um efeito leishmanicida significativo em concentrações menores, que podem ser atingidas a nível fisiológico, mesmo em tratamentos de três dias. A quarta geração revelou-se eficaz tanto nos ensaios de três como de sete dias, sendo que no ensaio de sete dias a sua eficácia era mais significativa.

Dado que as moléculas de terceira e quarta geração possuem características estruturais que lhes conferem uma menor propensão para o desenvolvimento de resistências parasitárias e como não apresentam os fatores limitantes, como o custo e a toxicidade dos fármacos atualmente disponíveis, é possível afirmar que os resultados agora obtidos permitem concluir que o seu uso poderá vir a constituir uma abordagem terapêutica promissora no tratamento da Leishmaniose. Além disso, vários autores, como Bianciardi *et al* (2004), descrevem melhorias clínicas em animais com Leishmaniose que foram tratados com fluoroquinolonas devido a infecções secundárias, sem que contudo, seja perceptível se as melhorias se devem ou não apenas à extinção da infecção secundária. Deste modo, é necessário que futuramente sejam desenvolvidos mais estudos *in vitro* e *in vivo* com estas e outras moléculas mais recentes e potentes, de forma a aferir melhor a sua eficácia.

CAPÍTULO IX. BIBLIOGRAFIA

- Al-Trawneh, S.A., Zahra, J.A., Kamal, M.R., El-Abadelah, M.M., Zani, F., Incerti, M., Cavazzoni, A., Alfieri, R.R., Petronini, P.G. & Vicini, P. (2010). Synthesis and biological evaluation of tetracyclic fluoroquinolones as antibacterial and anticancer agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18, 5873-5884.
- Alexandre-Pires, G., Brito, M.T.V., Algueró, C., Martins, C., Rodrigues, O.R., Fonseca, I.P. & Santos-Gomes, G. (2010). Canine leishmaniosis. Immunophenotypic profile of leukocytes in different compartments of symptomatic, asymptomatic and treated dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 137, 275-283.
- Andersen, A.H., Bendixen, C. & Westergaard, O. (1996). DNA topoisomerases. In DePamphilis, M.L. (Ed.), *DNA replication in eucaryotic cells*. (pp. 587-617). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Andes, D. & Craig, W.A. (2003). Pharmacodynamics of the new des-f(6)-quinolone garenoxacin in a murine thigh infection model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(12), 3935-3941.
- Appelbaum, P.C. & Hunter, P.A. (2000). The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 16, 5-15.
- Baneth, G., Koutinas, A., Solano-Gallego, L., Bourdeau, P. & Ferrer, L. (2008). Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends in Parasitology*, 24(7), 324-330.
- Bates, P.A. (2007). Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology*, 37, 1097-1106.
- Bian, Z., Tian, Y., Zhang, Z., Xu, F., Li, J. & Cao, X. (2007). High performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometric determination of balofloxacin in human plasma and its pharmacokinetics. *Journal of Chromatography B*, 850, 68-73.
- Bianciardi, P. (2011). Miltefosina: um tratamento novo e mais actual para a leishmaniose canina. *Veterinary Medicine*, 13(77), 47-52.
- Bianciardi, P., Fasanella, A., Manzillo V.F., Trotta, T., Aceti, A., Pagano, A., Gradoni, L. & Oliva, G. (2004). The efficacy of enrofloxacin, alone or combined with metronidazole, in the therapy of canine leishmaniasis. *Parasitology Research*, 93, 486–92.
- Blum, R.A., Schultz, R.W. & Schentag, J.J. (1990). Pharmacokinetics of lomefloxacin in renally compromised patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34(12), 2364-2368.
- Bowman, D.D. (1999). *Georgis' parasitology for veterinarians*. (7th ed.). (pp. 81-82). Pennsylvania: W. B. Saunders Company.

- Broccoli, S., Marquis, J., Papadopoulou, B., Olivier, M. & Drolet, M. (1999). Characterization of a *Leishmania donovani* gene encoding a protein that closely resembles a type IB topoisomerase. *Nucleic Acids Research*, 27(13), 2745-2752.
- Bryson, D.R. (1994). Levofloxacin. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetics and therapeutic efficacy [abstract]. *Drugs*, 47(4), 677-700.
- Burri, C., Bodley, A.L. & Shapiro, T.A. (1996). Topoisomerases in kinetoplastids. *Parasitology Today*, 12(6), 226-231.
- Campino, L. & Maia, C. (2010). Epidemiologia das Leishmanioses em Portugal. *Acta Médica Portuguesa*, 23, 859-864.
- Cester, C.C. & Toutain, P.L. (1997). A comprehensive model for enrofloxacin to ciprofloxacin transformation and disposition in dog. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 86(10), 1148-1155.
- Cheesman, S.J. (2000). The topoisomerases of protozoan parasites. *Parasitology Today*, 16(7), 277-281.
- Cortázar, T.M., Coombs, G.H. & Walker, J. (2007). *Leishmania panamensis*: comparative inhibition of nuclear DNA topoisomerase II enzymes from promastigotes and human macrophages reveals anti-parasite selectivity of fluoroquinolones, flavonoids and pentamidine. *Experimental Parasitology*, 116, 475-482.
- Das, A., Dasgupta, A., Sengupta, T. & Majumder, H.K. (2004). Topoisomerases of kinetoplastid parasites as potential chemotherapeutic targets. *Trends in Parasitology*, 20(8), 381-387.
- Das, B.B., Ganguly, A. & Majumder, H.K. (2008). DNA topoisomerases of *Leishmania*: the potential targets for anti-leishmanial therapy. In Majumder, H.K. (Ed.), *Drug targets in kinetoplastid parasites*. (pp. 103-115). New York: Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, LLC.
- Das, B.B., Sen, N., Dasgupta, S.B., Ganguly, A., Das, R. & Majumder, H.K. (2006a). Topoisomerase research of kinetoplastid parasite *Leishmania*, with special reference to development of therapeutics. *Indian Journal of Medical Research*, 123, 221-232.
- Das, B.B., Sengupta, T., Ganguly, A. & Majumder, H.K. (2006b). Topoisomerases of kinetoplastid parasites: why so fascinating? *Molecular Microbiology*, 62(4), 917-927.
- Didier, E.S., Bowers, L., Stovall, M.E., Kuebler, D., Mittleider, D., Brindley, P.J. & Didier, P.J. (2005). Antimicrosporidial activity of (fluoro)quinolones *in vitro* and *in vivo*. *Folia Parasitologica*, 52, 173-181.
- Drilca, K. & Zhao, X. (1997). DNA Gyrase, Topoisomerase IV and the 4-Quinolones. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(3), 377-392.
- Efthymiopoulos, C. (1997). Pharmacokinetics of grepafloxacin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 40(A), 35-43.

- Emmerson, A.M. & Jones, A.M. (2003). The quinolones: decades of development and use. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51(S1), 13-20.
- Farca, A.M., Miniscalco, B., Badino, P., Odore, R., Monticelli, P., Trisciuglio, A. & Ferroglio, E. (2012). Canine leishmaniosis: *in vitro* efficacy of miltefosine and marbofloxacin alone or in combination with allopurinol against clinical strains of *Leishmania infantum*. *Parasitology Research*, 110(6), 2509-2513.
- Fernández-Varón, E., Cárceles, C.M, Marín, P., Martos, N., Escudero, E. & Ayala, I. (2006). Pharmacokinetics of difloxacin after intravenous, intramuscular, and intragastric administration to horses. *American Journal of Veterinary Research*, 67(6), 1076-1081.
- Fish, D.N. & Chow, A.T. (1997). The clinical pharmacokinetics of levofloxacin [abstract]. *Clinical Pharmacokinetics*, 32(2), 101-119.
- Freitas-Junior, L.H., Chatelain, E., Kim, H.A & Siqueiro-Neto, J.L. (2012). Visceral leishmaniasis: What do we have, what do we need and how to deliver it? *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 2, 11-19.
- Gasser, T.C., Graversen, P.H. & Madsen, P.O. (1987). Fleroxacin (RO 23-6240) distribution in canine prostatic tissue and fluids. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 31(7), 1010-1013.
- Górniak, S.L. (2006). Quimioterápicos. In Spinosa, H.S, Górniak, S.M, Bernardi, M.M., *Farmacologia aplicada à medicina veterinária*. (4.^a ed). (pp. 453-464). Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A.
- Gossage, S.M., Rogers, M.E. & Bates, P.A. (2003). Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. *International Journal for Parasitology*, 33, 1027-1034.
- Gramiccia, M. (2011). Recent advances in leishmaniosis in pet animals: epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. *Veterinary Parasitology*, 181, 23-30.
- Hamel, B., Mottet, N., Audran, M., Costa, P. & Bressolle, F. (2000). Pharmacokinetics of enoxacin and its oxometabolite after multiple oral dosing and penetration into prostatic tissue. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46, 993-996.
- Hanke, T., Ramiro, M.J., Trigueros, S., Roca, J. & Larraga, V. (2003). Cloning, functional analysis and post-transcriptional regulation of a type II DNA topoisomerase from *Leishmania infantum*. A new potential target for anti-parasite drugs. *Nucleic Acids Research*, 31(16), 4917-4928.
- Haritova, A.M., Rusenova, N.V., Parvanov, P.R., Lashev, L.D & Fink-Gremmels, J. (2006). Integration of pharmacokinetic and pharmacodynamic indices of marbofloxacin in turkeys. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(11), 3779-3785.
- Ismail, M. (2007). Disposition kinetics of difloxacin after intravenous, intramuscular and subcutaneous administration in calves. *Veterinary Research Communications*, 31, 467-476.

- Kozawa, O., Uematsu, T., Matsuno, H., Niwa, M., Nagashima, S. & Kanamaru, M. (1996). Comparative study of pharmacokinetics of two new fluoroquinolones, balofloxacin and grepafloxacin, in elderly subjects. *American Society for Microbiology*, 40(12), 2824-2828.
- Kulikowicz, T. & Shapiro, T.A. (2006). Distinct genes encode type II topoisomerases for the nucleus and mitochondrion in the protozoan parasite *Trypanosoma brucei*. *Journal of Biological Chemistry*, 281(6), 3048-3056.
- Lees, P. & AliAbadi, F.J. (2002). Antimicrobianos que inibem la funció de los ácidos nucleicos. In Botana, L.M., Landoni, F., Martín-Jiménez, T., *Farmacología y terapéutica veterinaria*. (pp. 484-492). Madrid: McGraw-Hill/Interamericana de España, S. A. U.
- Martinez, M., McDermott, P. & Walker, R. (2006). Pharmacology of the fluoroquinolones: a perspective for the use in domestic animals. *The Veterinary Journal*, 172, 10-28.
- McConville, M.J. & Handman, E. (2007). The molecular basis of *Leishmania* pathogenesis. *International Journal for Parasitology*, 37, 1047-1051.
- McDonald, M. & Blondeau, J.M. (2010). Emerging antibiotic resistance in ocular infections and the role of fluoroquinolones. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, 36, 1588-1598.
- Mehlhorn, H. (Ed.) (2001). *Enciclopedia de parasitología — diseases, treatment, therapy*. (2nd ed). (pp. 277-289). Düsseldorf: Springer.
- Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Oliva, G. & Baneth, G. (2008). Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends in Parasitology*, 24(8), 371-377.
- Niwa, M., Hotta, K., Kanamori, Y., Matsuno, H., Kozawa, O., Hirota, M. & Uematsu, T. (2001). Differential uptake of grepafloxacin by human circulating blood neutrophils and those exudated into tissues. *European Journal of Pharmacology*, 428, 121-126.
- Observatório Nacional das Leishmanioses. Leishmaniose canina: epidemiologia. Acedido em Nov. 9, 2012, em <http://www.onleish.org/index.php?article=25&visual=3>.
- Pallo-Zimmerman, L.M., Byron, J.K. & Graves, T.K. (2010). Fluoroquinolones: then and now. *Compendium Continuing Education for Veterinarians*, 32(7), E1-9.
- Papich, M.G. & Riviere, J.E. (2001). Fluoroquinolones and antimicrobial drugs. In Adams, H.R. (Ed.), *Veterinary pharmacology and therapeutics*. (8th ed). (pp. 898-917). Ames, Iowa: Blackwell Publishing.
- Pearson, R.D. & Sousa, A.Q. (1996). In Benett, J.C. & Plum, F. (Eds.), *Cecil textbook of medicine*. (20th ed.). (pp. 1903-1907). Philadelphia: W. B. Saunders Company.
- Pinto, C. (2012, Junho). Leishmaniose canina e felina: as novas armas no combate à doença. *Veterinária Atual*, 51, 14-17.

- Randinitis, E.J., Brodfuehrer, J.I, Eiseman, I. & Vassos, A.B. (2001). Pharmacokinetics of clinafloxacin after single and multiple doses. *American Society for Microbiology*, 45(9), 2529-2535.
- Roberts, L.S. & Janovy, J. (2009). *Gerald D. Schmidt & Larry S. Roberts' foundations of parasitology*. (8th ed.). (pp. 77-85). New York: McGraw-Hill.
- Romão, P.R.T., Dias, R.O, Cruz, K.K., Marques, F.C.S. & Monteiro, M.C. (2007). Leishmaniose: resposta imune e mecanismos antioxidantes de escape. *Revista de Pesquisa e Extensão em Saúde*, 3(1), 1-10.
- Rougier, S., Hasseine, L., Delaunay, P., Michel, G. & Marty, P. (2012). One-year clinical and parasitological follow-up of dogs treated with marbofloxacin for canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, 186, 245-253.
- Rougier, S., Vouldoukis, I., Fournel, S., Pérès, S. & Woehrlé, F. (2008). Efficacy of different treatment regimens of marbofloxacin in canine visceral leishmaniosis: a pilot study. *Veterinary Parasitology*, 153, 244-254.
- Roy, B., Nandi, U., Das, A. & Pal, T.K. (2011). Acute and twenty-eight days repeated oral dose toxicity study of besifloxacin in Wistar albino rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 32, 82-101.
- Santos-Gomes, G. & Fonseca, I. P. (Autoras coordenadoras) (2008). *Leishmaniose Canina*. (pp. 7-23, 41-49, 53-67, 69-80, 93-101). Lisboa: Chaves Ferreira – Publicações, S.A.
- Sappal, R., Chaudhary, R.K., Sandhu, H.S. & Sidhu, P.K. (2009). Pharmacokinetics, urinary excretion and plasma protein binding of danofloxacin following intravenous administration in buffalo calves (*Bubalus bubalis*). *Veterinary Research Communications*, 33, 659-667.
- Sarasola, P., Lees, P., AliAbadi, F.S., McKellar, Q.A., Donachie, W., Marr, K.A., Sunderland, S.J. & Rowan, T.G. (2002). Pharmacokinetic and pharmacodynamic profiles of danofloxacin administered by two dosing regimens in calves infected with *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(9), 3013-3019.
- Seixas, R., Alho, A.M., Guerra, D. & Carvalho, L.M. (2011). Doenças caninas de transmissão vectorial: uma picada com muitas consequências! *Veterinary Medicine*, 13(77), 23-46.
- Semenza, J.C. & Menne, B. (2009). Climate change and infectious diseases in Europe. *Lancet Infectious Diseases*, 9, 365-375.
- Sherding, R.G. (2006). Toxoplasmosis and other systemic protozoal infections. In Bichard, S.J., Sherding, R.G., *Saunders manual of small animal practice*. (3rd ed.). (pp. 219-229). St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier.
- Simões, P.B. (2012, Junho). Diagnóstico da leishmaniose canina. *Veterinária Atual*, 51, p.42.
- Solano-Gallego, L., Koutinas, A., Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G. & Baneth, G. (2009). Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, 165, 1-18.

- Solano-Gallego, L., Miró, G., Koutinas, A., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G. & Baneth, G. (2011). LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasites & Vectors*, 4, 1-16.
- Stuck, A.E, Kim, D.K. & Frey, F.J. (1992). Fleroxacin clinical pharmacokinetics [abstract]. *Clinical Pharmacokinetics*, 22(2), 116-131.
- Torri, A.F, Carpenter, L.R. & Englund, P. (1996). Kinetoplast DNA replication. In DePamphilis, M.L. (Ed.), *DNA replication in eucaryotic cells*. (pp. 1029-1042). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Urquhart, G.M., Armour, J., Duncan, J.L., Dunn, A.M., Jennings, F.W. (1996). *Veterinary parasitology*. (2nd ed.). (pp. 190-192). Ames, Iowa: Blackwell Publishing.
- Vouldoukis, I., Rougier, S., Dugas, B., Pino, P., Mazier, D. & Woehrlé, F. (2006). Canine visceral leishmaniasis: comparison of in vitro leishmanicidal activity of marbofloxacin, meglumine antimoniate and sodium stibogluconate. *Veterinary Parasitology*, 135, 137-146.
- Warburg, A., Shoshana, G. & Deutsch, J. (2008). Xanthine in urine stimulates growth of *Leishmania* promastigotes in vitro. *Journal of Microbiological Methods*, 57, 136-138.
- Wart, S.V., Phillips, L., Ludwig, E.A., Russo, R., Gajjar, D.A, Bello, A., Ambrose, P.G., Costanzo, C., Grasela, T.H, Echols, R. & Grasela, D.M. (2004). Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of garenoxacin in patients with community-acquired respiratory tract infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(12), 4766-4777.
- Wikipedia (2012). Balofloxacin. Acedido em Jun. 26, 2012. Disponível em: <http://en.wikipedia.org/wiki/Balofloxacin>.
- Wikipedia (2012). Besifloxacin. Acedido em Jun. 26, 2012. Disponível em: <http://en.wikipedia.org/wiki/Besifloxacin>.
- Wikipedia (2012). Ciprofloxacin. Acedido em Jun. 26, 2012. Disponível em: <http://en.wikipedia.org/wiki/Ciprofloxacin>.
- Wikipedia (2012). Clinafloxacin. Acedido em Jun. 26, 2012. Disponível em: <http://en.wikipedia.org/wiki/Clinafloxacin>.
- Wikipedia (2012). Danofloxacin. Acedido em Jun. 26, 2012. Disponível em: <http://en.wikipedia.org/wiki/Danofloxacin>.
- Wikipedia (2012). Difloxacin. Acedido em Jun. 26, 2012. Disponível em: <http://en.wikipedia.org/wiki/Difloxacin>.

- Wikipedia (2012). Enoxacin. Acedido em Jun. 26, 2012. Disponível em: <http://en.wikipedia.org/wiki/Enoxacin>.
- Wikipedia (2012). Enrofloxacin. Acedido em Jun. 26, 2012. Disponível em: <http://en.wikipedia.org/wiki/Enrofloxacin>.
- Wikipedia (2012). Fleroxacin. Acedido em Jun. 26, 2012. Disponível em: <http://en.wikipedia.org/wiki/Fleroxacin>.
- Wikipedia (2012). Garenoxacin. Acedido em Jun. 26, 2012. Disponível em: <http://en.wikipedia.org/wiki/Garenoxacin>.
- Wikipedia (2012). Grepafloxacin. Acedido em Jun. 26, 2012. Disponível em: <http://en.wikipedia.org/wiki/Grepafloxacin>.
- Wikipedia (2012). Levofloxacin. Acedido em Jun. 26, 2012. Disponível em: <http://en.wikipedia.org/wiki/Levofloxacin>.
- Wikipedia (2012). Lomefloxacin. Acedido em Jun. 26, 2012. Disponível em: <http://en.wikipedia.org/wiki/Lomefloxacin>.
- Wikipedia (2012). Marbofloxacin. Acedido em Jun. 26, 2012. Disponível em: <http://en.wikipedia.org/wiki/Marbofloxacin>.
- Wikipedia (2012). Nalidixic acid. Acedido em Jun. 26, 2012. Disponível em: http://en.wikipedia.org/wiki/Nalidixic_acid.
- Wise, R., Jones, S., Das, I. & Andrews, J.M. (1998). Pharmacokinetics and inflammatory fluid penetration of clinafloxacin. *American Society for Microbiology*, 42(2), 428-430.
- World Health Organization (2010). *Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO expert committee on the control of leishmaniasis, Geneva. 22-26 March 2010*. Genebra: WHO.
- Zhanel, G.G. & Noreddin, A.M. (2001). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the new fluoroquinolones: focus on respiratory infections. *Current Opinion in Pharmacology*, 1, 459-463.
- Zuma, A.A., Cavalcanti, D.P., Maia, M.C.P., Souza, W., Motta, M.C.M. (2011). Effect of topoisomerase inhibitors and DNA-binding drugs on the cell proliferation and

ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 37, 449-456.

CAPÍTULO X. ANEXOS

Anexo 1 – Alinhamento múltiplo das sequências aminoacídicas, destacando-se com uma gradação a cinzento, as zonas de maior semelhança entre as seguintes espécies: *Leishmania infantum* (A4HWL4), *Crithidia fasciculata* (P27570), *Trypanosoma cruzi* (E7LM06), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (estirpe KF147) (D2BQ32), *Canis familiaris* (F1Q2M4), *Mus musculus* (Q01320), *Equus caballus* (F7CL38), *Haemophilus haemolyticus* M21621 (F9GWX2), *Yersinia pestis* (Q0W9U2), *Saccharomyces cerevisiae* (estirpe ATCC 204508/S288c) (P06786), *Homo sapiens* (Q71UH4), *Streptococcus thermophilus* JIM 8232 (F8LYS0).

1	-----MTDASKYKKLTPIDHVLRLPEMYVGSJETQP	31	A4HWL4	A4HWL4_LEIIN
1	-----MTDASKYQKLTPIHVLRLPEMYVGSJETQS	31	P27570	TOP2_CRIFA
1	-----MAEASKYKKLTPIDHVLRLPEMYVGSJDTSS	31	E7LM06	E7LM06_TRYCR
1	-----MNEENKNLEMLADEYDASQIQVLEGLAVRMKPGMYIGSTS-KE	43	D2BQ32	D2BQ32_LACLK
1	MEVSPLQPVNE--NMQISKTKKNEADAKKRLSIERIYQKKTQLEHILLRPDTYIGSVELVT	58	F1Q2M4	F1Q2M4_CANFA
1	MELSPLQPVNE--NMLMNK-KKNEGDKRLSIERIYQKKTQLEHILLRPDTYIGSVELVT	57	Q01320	TOP2A_MOUSE
1	----TLFDQNNAAARKEELETANKNDPSKKLSVERVYQKKTQLEHILLRPDTYIGSVEPLT	56	F7CL38	F7CL38_HORSE
1	-----MSETTNDNYGASSIKVLKGLDAVRKRPKMYIGDTDDGT	38	F9GWX2	F9GWX2_HAEHA
1	-----MSNTYDSSSIKVLKGLDAVRKRPKMYIGDTDDGT	34	Q0W9U2	Q0W9U2_YERPE
1	-----MSTEPVSASDKYQKISQLEHILKRPDTYIGSVETQE	36	P06786	TOP2_YEAST
1	-----NNAAKKEESETANKNDSSKKLSVERVYQKKTQLEHILLRPDTYIGSVEPLT	51	Q71UH4	Q71UH4_HUMAN
1	-----MTDELKNLEEKAEYDASQIQVLEGLAVRMKPGMYIGSTS-KE	43	F8LYS0	F8LYS0_STRTR
	: : : : * * : .			
32	TPMYIFDPEKGRMVWETMRVNQGLLKIVDEILLNAADNINNSKGSVRQTYISIHIS-DTG	90	A4HWL4	A4HWL4_LEIIN
32	IPMFVFDPAKGKMWESMQVNQGLLKIVDEILLNAADNINNSVRGARTYISIKIS-DSG	90	P27570	TOP2_CRIFA
32	SSMFVFDHEKGRMVWESLKVNHGLLKIVDEILLNASDNIANK--GGRMTYIRVHIT-EAG	88	E7LM06	E7LM06_TRYCR
44	G-----LHHLVWEIVDNSIDEA----LAGFASHIEVFIE-PDN	76	D2BQ32	D2BQ32_LACLK
59	QQMWWYDEDIG--MNYREVTFFVGLYKIFDEILVNAADNK---QRDPKMSCIRVTIDPENN	114	F1Q2M4	F1Q2M4_CANFA
58	QQMWWYDEDVG--INYREVTFFVGLYKIFDEILVNAADNK---QRDPKMSCIRVTIDPENN	113	Q01320	TOP2A_MOUSE
57	QLMWYDEDVG--MNCREVTFFVGLYKIFDEILVNAADNK---QRDKNMTCIKVSIDPESN	112	F7CL38	F7CL38_HORSE
39	G-----LHHMVFEVDNAIDEA----LAGHCSDIIVTIH-DDN	71	F9GWX2	F9GWX2_HAEHA
35	G-----LHHMVFEVDNAIDEA----LAGHCKEILVTIH-ADN	67	Q0W9U2	Q0W9U2_YERPE
37	QLQWIYDEETDCMIEKNVTIVPGLFKIFDEILVNAADNK---VRDPSMKRIDVNIHAEH	93	P06786	TOP2_YEAST
52	QFMWWYDEDVG--MNCREVTFFVGLYKIFDEILVNAADNK---QRDKNMTCIKVSIDPESN	107	Q71UH4	Q71UH4_HUMAN
44	G-----LHHLVWEIVDNSIDEA----LAGFASHIKVFIE-PDN	76	F8LYS0	F8LYS0_STRTR
	* : : . * : : * : * : . * : *			
91	EITVENDGAGLPIVRSREHKMYIPEMVFGHLLTSSNYNNDSTSTTAGRHGYGAKLTNLS	150	A4HWL4	A4HWL4_LEIIN
91	EIMVENDGAGLPIVKSKEHKMYIPEMVFGHLLTSSNYNNDASSTTAGRHGYGAKLTNLS	150	P27570	TOP2_CRIFA
89	EITIENDGAGIPIVRSKEHKLYIPEMVFGHLLTSSNYDDTSQNAVAGRHGYGAKLTNLS	148	E7LM06	E7LM06_TRYCR
77	SITVVDDGRGIPVDIQEKTGRPAVETVFTVLHAGGKFGGGGYKVSGGLHGVGSSVNNALS	136	D2BQ32	D2BQ32_LACLK
115	LISIWNNKGIPVVEHKVEKMYVPALIFGQLLTSSNYDDDEKKVTGGRNGYGAKLCNIFS	174	F1Q2M4	F1Q2M4_CANFA
114	VISIWNNKGIPVVEHKVEKIYVPALIFGQLLTSSNYDDDEKKVTGGRNGYGAKLCNIFS	173	Q01320	TOP2A_MOUSE
113	IISIWNNKGIPVVEHKVEKVYPALIFGQLLTSSNYDDDEKKVTGGRNGYGAKLCNIFS	172	F7CL38	F7CL38_HORSE
72	SVSVQDDGRGIPVDIHPEEGVSAAEVIMTVLHAGGKFDDNSYKVSGGLHGVGSSVNNALS	131	F9GWX2	F9GWX2_HAEHA
68	SVSVQDDGRGIPTGMHDEEGVSAAEVIMTVLHAGGKFDDNSYKVSGGLHGVGSSVNNALS	127	Q0W9U2	Q0W9U2_YERPE
94	TIEVKNDGKGIPVIEIHNKENIYIPEMIFGHLLTSSNYDDDEKKVTGGRNGYGAKLCNIFS	153	P06786	TOP2_YEAST
108	IISIWNNKGIPVVEHKVEKVYPALIFGQLLTSSNYDDDEKKVTGGRNGYGAKLCNIFS	167	Q71UH4	Q71UH4_HUMAN
77	SITVVDDGRGIPVDIQEKTGRPAVETVFTVLHAGGKFGGGGYKVSGGLHGVGSSVNNALS	136	F8LYS0	F8LYS0_STRTR
	: : : : * * : : : * : : : * * : * : *			

151	TKFSV--VCRTDGREFFHMSWTDHMRMATAPRVNVRVDPKEKNVTRVKFMPDYAHFGFPNAS	208	A4HWL4	A4HWL4_LEIIN
151	TKFSV--VCRTAGREFHMSWTDHMRMATAPRVSNVDPKEKNVTRVTFMPDYAHFGFPTAA	208	P27570	TOP2_CRIFA
149	HRFSV--CCRTKGKEFHMSWHDHMRATAPRVSNVDPKEKNLTRVKFLPDYERFGLDANK	206	E7LM06	E7LM06_TRYCR
137	TVLDV--TVHKDQKQYQYQYHRLGVGD---LKIIGETDRRGTTVHFVPDPEIFTET-VE	190	D2BQ32	D2BQ32_LACLK
175	TKFTVETASREYKMFQKQWMDNMGRAGEMELRPF--NGEDYTCITFQPDLSKFKMQ--S	230	F1Q2M4	F1Q2M4_CANFA
174	TKFTVETASREYKMFQKQWMDNMGRAGEMELKPF--SGEDYTCITFQPDLSKFKMQ--S	229	Q01320	TOP2A_MOUSE
173	TKFTVETACKKEYKHSFKQWMMNNMMKTSEAKIKHF--DGEDYTCITFQPDLSKFKME--K	228	F7CL38	F7CL38_HORSE
132	DKLQL--TIRROGHVHEQFYHLEGPQAP---LTVIGDTEATGTTVRFWPSDDIFA-I-TT	184	F9GWX2	F9GWX2_HAEHA
128	EKLEL--VIRREGKVHEQTYKMGVQPAP---LKVVGETEQGTGTTVRFWPSFQTFNN-TE	181	Q0W9U2	Q0W9U2_YERPE
154	TEFILETADLVNGQKYVQKWNMMKSICHPPKITSYK-KGFSYTKVTFKPDLTFRGMK--E	210	P06786	TOP2_YEAST
168	TKFTVETACKKEYKHSFKQWMMNNMMKTSEAKIKHF--DGEDYTCITFQPDLSKFKME--K	223	Q71UH4	Q71UH4_HUMAN
137	TQLDV--KVYKNGHIFHQEYKRGVVVD---LRIIGETEEHGTTVHFIPDPEIFQET-TE	190	F8LYS0	F8LYS0_STRTR
<div style="display: flex; justify-content: space-between; width: 100%;"> 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 </div>				
209	ISLDMKRVLHHRIMDLAAMFSKIEVRLNNVPFGF-----RTFTDYARLYSLPGLD	258	A4HWL4	A4HWL4_LEIIN
209	ISLDMKRVLHHRIMDLAAMFSKIEVRLNNVPFGF-----QTFNDYARLYSLPGAD	258	P27570	TOP2_CRIFA
207	ISHDMKRVLHHRIMDLAAMFPSIEISLNGVPFAF-----KSFADYAMLYSSPSSS	256	E7LM06	E7LM06_TRYCR
191	FDFD---KLATRVRELAFNLNRLGRISLTDKREGNEKNEVHFHYEGGIQSYVEYLNENKTV	247	D2BQ32	D2BQ32_LACLK
231	LDKDIALMVRRAYDIAGSTKDVKVFNLGNKLPV-----KGFRSYVDMYLDKQVD	280	F1Q2M4	F1Q2M4_CANFA
230	LDKDIALMVRRAYDIAGSTKDVKVFNLGNKSLPV-----KGFRSYVDLYLDKQVD	279	Q01320	TOP2A_MOUSE
229	LDKDIALMTRRAYDLAGSCKGVKVMFNGKKLPV-----NGFRSYVDLYVVKDKLD	278	F7CL38	F7CL38_HORSE
185	FDYK---ILAKRLRELSFLNSGVSIIRLIDKRDGA---EDHFHYEGGIQAFVEYLNKNKNP	238	F9GWX2	F9GWX2_HAEHA
182	FQYE---ILAKRLRELSFLNSGVSIKLDKRNNDK---EDHFHYEGGIKAFVEYLNKNKNP	235	Q0W9U2	Q0W9U2_YERPE
211	LDNDILGMVRRVYDINGSVRDINVYLNKSKSLKI-----RNFKNYVELYLSLEK	260	P06786	TOP2_YEAST
224	LDKDIALMTRRAYDLAGSCKGVKVMFNGKKLPV-----NGFRSYVDLYVVKDKLD	273	Q71UH4	Q71UH4_HUMAN
191	FDFG---KLAKRFQELAFNLNKLRLISITDKREGLEQ-EKHYHYEGGITSYVKYINENKDV	246	F8LYS0	F8LYS0_STRTR
<div style="display: flex; justify-content: space-between; width: 100%;"> 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 </div>				
259	GS-----MPPEPFVYTSP--NGSVAYVPQLTQS-PKRIVGVVNGVVYNGGTHC	304	A4HWL4	A4HWL4_LEIIN
259	GA-----MPPEPFVHTGP--NGSIAFVPLTQS-PKRIVGVVNGVVYNGGTHC	304	P27570	TOP2_CRIFA
257	GE-----MPPAPFVYESR--NGAIAFIPSLTAG-TRRIFGVVNGVVYTHNGGTHC	302	E7LM06	E7LM06_TRYCR
248	-----IFPEAIFTEGEMDGAIEVAMQYTDYHSVMSFANNINTHEGGTHE	294	D2BQ32	D2BQ32_LACLK
281	ET-----GNPLKIIHEQV--NPRWEVCLTMSEK-GFQQISFVNSIATSKGGRHV	326	F1Q2M4	F1Q2M4_CANFA
280	ET-----GNSLKIHEQV--NPRWEVCLTMSEK-GFQQISFVNSIATSKGGRHV	325	Q01320	TOP2A_MOUSE
279	ET-----GVALKVIHELA--NERWDVCLTLSEK-GFQQISFVNSIATTKGGRHV	324	F7CL38	F7CL38_HORSE
239	-----IHPKPFYFTAEDKGIGVEVALQWNDGVNENVYCFNNIPORDGGTHL	285	F9GWX2	F9GWX2_HAEHA
236	-----IHPKVIFYFTMKDDIGVEVALQWNDGVNENVYCFNNIPORDGGTHL	282	Q0W9U2	Q0W9U2_YERPE
261	KRQLDNGEDGAAKSDIPTILYERI--NNRWEVAFVSDI-SFQQISFVNSIATTMGGTHV	317	P06786	TOP2_YEAST
274	ET-----GVALKVIHELA--NERWDVCLTLSEK-GFQQISFVNSIATTKGGRHV	319	Q71UH4	Q71UH4_HUMAN
247	-----IFDEPIYTYGEMDGISVEVAMQYTTGYHETVMSFANNIHTHEGGTHE	293	F8LYS0	F8LYS0_STRTR
<div style="display: flex; justify-content: space-between; width: 100%;"> 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 </div>				
305	NAAMDILDSCLDSLS---KNFKKNGKVVDNTRVQRHFTVLVFLIQTQPKFDSQSKARLVS	361	A4HWL4	A4HWL4_LEIIN
305	TSAMEILETGLDLSLS---RSLKKDGKVIDNTRVARHFTVLVFLIQSQPKFDSQSKARLVS	361	P27570	TOP2_CRIFA
303	NAAQEVQLSSLESVE---KALKKDNKVIDNTRVLRHFMILVFLVQVQPKFDSQSKARLVS	359	E7LM06	E7LM06_TRYCR
295	QGFRTALTRVINNYAKQNKILKENEDNLTDGDDVREGLTAVISVKHPNPQFEGQTKTKLGN	354	D2BQ32	D2BQ32_LACLK
327	DYIADQIVTKLVVDV---KKKNKGGVAVKAHVKNHMMWIFVNALIENPTFDSQTKENMTL	383	F1Q2M4	F1Q2M4_CANFA
326	DYVADQIVSKLVVDV---KKKNKGGVAVKAHVKNHMMWIFVNALIENPTFDSQTKENMTL	382	Q01320	TOP2A_MOUSE
325	DYVVDQVSKLIEVV---KKKNKAGVSVKPFQVKNHMMWIFVNALIENPTFDSQTKENMTL	381	F7CL38	F7CL38_HORSE
286	AGFRGALTRSLNSYMENEGMLKKEKVATSGDDAREGLVAIISVKVPDPKFSSQTKDKLVS	345	F9GWX2	F9GWX2_HAEHA
283	VGFRMTAMTRTLNSYMDKEGYSKAKISATGDDAREGLAVSVKVPDPKFSSQTKDKLVS	342	Q0W9U2	Q0W9U2_YERPE
318	NYITDQIVKKISEIL---KKKKKK--SVKSFQIKNNMFIINCLINPAFTSQTKEQLTT	372	P06786	TOP2_YEAST
320	DYVVDQVSKLIEVV---KKKNKAGVSVKPFQVKNHMMWIFVNALIENPTFDSQTKENMTL	376	Q71UH4	Q71UH4_HUMAN
294	QGFRTALTRVINDYARQNKILKEKDDNLTDGDDVREGLTAVISVKHPNPQFEGQTKTKLGN	353	F8LYS0	F8LYS0_STRTR
<div style="display: flex; justify-content: space-between; width: 100%;"> 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 </div>				
362	TVTMRPVPRKNTLEKYLER---MP-----FLEAHVNSMDDQLANELNKEIGAGRRLSSKTL	413	A4HWL4	A4HWL4_LEIIN
362	TVTMRPVPRKNTLEKYLER---MP-----FLEAHVNSMDDQLANELNKEIGAGRRLSSKTL	413	P27570	TOP2_CRIFA
360	VPTMRPVPRKNTLEKYLER---MP-----FLEAHVNTVTGQLADELNKEMAGGRMSSKSL	411	E7LM06	E7LM06_TRYCR
355	SEVTGIVNKLFAEALPTFMLENPQVARKIVEKILASKARIAA---KRAREVTRKKSGL	411	D2BQ32	D2BQ32_LACLK
384	QVKSFGSTCQLSEKFIKAATGCG-----IVESILNWVKFKAQIQLNKKCSA---VKHNR	434	F1Q2M4	F1Q2M4_CANFA
383	QAKSFGSTCQLSEKFIKAATGCG-----IVESILNWVKFKAQIQLNKKCSA---VKHNR	433	Q01320	TOP2A_MOUSE
382	QPKSFGSTCQLSEKFIKAATGCG-----IVESILNWVKFKAQIQLNKKCSA---VKHNR	432	F7CL38	F7CL38_HORSE
346	SEVKSASVESAMNEKMQEYLLNPADAKIIVNQIIMAAAREAA---RKAREMTRRKGLD	402	F9GWX2	F9GWX2_HAEHA
343	SEVKTAVETLMNEKLVYLLNPDAKIVVGKIIDAAREAA---RKAREMTRRKGLD	399	Q0W9U2	Q0W9U2_YERPE
373	RVKDFGSRCEIPLEYINKIMKTD-----LATRMFEIADANEEN-ALKKSDG---TRKSR	422	P06786	TOP2_YEAST
377	QPKSFGSTCQLSEKFIKAATGCG-----IVESILNWVKFKAQIQLNKKCSA---VKHNR	427	Q71UH4	Q71UH4_HUMAN
354	SEVVKITNRLFSEALSRLLENPAIAKKIVEKILASKARIAA---KRAREVTRKKSGL	410	F8LYS0	F8LYS0_STRTR
<div style="display: flex; justify-content: space-between; width: 100%;"> 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 </div>				
414	ISAIT-KLVDTASSRPDGRNIRTLIITEGDSAKALALNSLSSEQKQKCGVFPPLRGKLLNV	472	A4HWL4	A4HWL4_LEIIN
414	ISSIT-KLVDTASSRSDGKNIRTLIVTEGDSAKALALNSLSSEQKQKCGVFPPLRGKLLNV	472	P27570	TOP2_CRIFA
412	ISSIT-KLVDTATTRDPRFVRTLIVTEGDSAKALALNSLSSEQKQKCGVFPPLRGKLLNV	470	E7LM06	E7LM06_TRYCR
412	ISNLPGLAD---CSSNPEQTELFIVEGDSAGGSAGSGR---NREFQAILPIRGKILNV	465	D2BQ32	D2BQ32_LACLK
435	IKGIP-KLDDANDAGGRNSNECTLILTEGDSAKTAVSGLGVVGRDQYGVFPPLRGKILNV	493	F1Q2M4	F1Q2M4_CANFA
434	IKGIP-KLDDANDAGGRNSNECTLILTEGDSAKTAVSGLGVVGRDQYGVFPPLRGKILNV	492	Q01320	TOP2A_MOUSE
433	IKGIP-KLDDANDAGGRNSLECTLILTEGDSAKTAVSGLGVVGRDQYGVFPPLRGKILNV	491	F7CL38	F7CL38_HORSE
403	IAGLPGKLAD---CQEDPALSELYLVEGDSAGGSAGSGR---DRKQAILPLKGIKILNV	456	F9GWX2	F9GWX2_HAEHA
400	IAGLPGKLAD---CQEDPALSELYLVEGDSAGGSAGSGR---NRKNQAILPLKGIKILNV	453	Q0W9U2	Q0W9U2_YERPE
423	ITNYP-KLEDANKAGTKEGYKCTLVLTEGDSALSLAVAGLVGRDQYGVFPPLRGKILNV	481	P06786	TOP2_YEAST
428	IKGIP-KLDDANDAGGRNSLECTLILTEGDSAKTAVSGLGVVGRDQYGVFPPLRGKILNV	486	Q71UH4	Q71UH4_HUMAN
411	ISNLPGLAD---CSSNPEMNELFIVEGDSAGGSAGSGR---NREFQAILPIRGKILNV	464	F8LYS0	F8LYS0_STRTR
<div style="display: flex; justify-content: space-between; width: 100%;"> 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 </div>				

473	RNKNLRLKTCKELQDLFLSLGLELGKEYRSP---AELRYQRLLVMTDQDADGSHIKGLV	529	A4HWL4	A4HWL4_LEIIN
473	RNKNLRLKTCKELQDLFLALGLELGKTYKSP---AELRYQRLLVMTDQDADGSHIKGLV	529	P27570	TOP2_CRIFA
471	RNKNLRLKKNCKELQELFCALGLELGKIYKDA---EELRYQRLLVMTDQDADGSHIKGLV	527	E7LM06	E7LM06_TRYCR
466	EKATMDKILANEEIRSLFTAMGTGFGA-DYDL---SKARYHKLIVMTDADVDGAHIRTLL	521	D2BQ32	D2BQ32_LACLK
494	REASHKQIMENAEINNIKIVGLQYKKNYDDEDSLKTLRYGKIMIMTDQDQDGSHIKGLL	553	F1Q2M4	F1Q2M4_CANFA
493	REASHKQIMENAEINNIKIVGLQYKKNYDEDSLKTLRYGKIMIMTDQDQDGSHIKGLL	552	Q01320	TOP2A_MOUSE
492	REASHKQIMENAEINNIKIVGLQYKKSYYDAESLKTLRYGKIMIMTDQDQDGSHIKGLL	551	F7CL38	F7CL38_HORSE
457	EKARFDKMLSSQEVGTLITALGCGIGRDEYNP---DKLRYHHIIIMTDADVDGSHIRTLL	513	F9GWX2	F9GWX2_HAEHA
454	EKARFDKMLSSQEVATLITALGCGIGRDEYNP---DKLRYHHIIIMTDADVDGSHIRTLL	510	Q0W9U2	Q0W9U2_YERPE
482	REASADQILKNAEIQAIKKIMGLQHRKKYEDT---KSLRYGHLIMITDQDHDGSHIKGLI	538	P06786	TOP2_YEAST
487	REASHKQIMENAEINNIKIVGLQYKKSYYDAESLKTLRYGKIMIMTDQDQDGSHIKGLL	546	Q71UH4	Q71UH4_HUMAN
465	EKASMDKILANEEIRSLFTAMGTGFGS-EFDV---SKARYHKLIVMTDADVDGAHIRTLL	520	F8LYS0	F8LYS0_STRTR
. : . : : : : : . * : : : : : : : : : : : : *				
530	INAFESLWPKLLQNNPGYISLFTPIVKIKVSGKSKEVIAFHSFRDFHRWQRAHPS----	585	A4HWL4	A4HWL4_LEIIN
530	INAFESLWPSLLQNNPGYISLFTPIVKIKVNGKAKEVVAFHSFRDFHRWQRAHPS----	585	P27570	TOP2_CRIFA
528	INAFESLWPSLLNPNPGFISIFSTPIVKVRLRDKS---THSFFSLKEFKHWKQTHGN----	581	E7LM06	E7LM06_TRYCR
522	LTFLFYRMRPVVE--AGYVYIAQPPYIKVKGSETKEYIQPGE--NQE-----	565	D2BQ32	D2BQ32_LACLK
554	INFIHNNWPSLLR--HRFLEEFITPIVKVSKN---KQEMAFYSLPEFEWKSSTPNH----	605	F1Q2M4	F1Q2M4_CANFA
553	INFIHNNWPSLLR--HRFLEEFITPIVKVSKN---KQEIAFYSLPEFEWKSSTPNH----	604	Q01320	TOP2A_MOUSE
552	INFIHNNWPSLLK--HGFLEEFITPIVKASKN---KQELSFYSIPEFDEWKKHIENQ----	603	F7CL38	F7CL38_HORSE
514	LTFFFYRMPPELIE--RGYVYIAQPPYIKVKGKQER-YIKDAD--EMEYELTLALDGAE	568	F9GWX2	F9GWX2_HAEHA
511	LTFFFYRMPPELIE--RGHVYIAQPPYIKVKGKQEQ-YIKDDD--AMEQYQMTLALDGAA	565	Q0W9U2	Q0W9U2_YERPE
539	INFLESSFPGLLDI--QGFLLEFITPIIKVSIKPTKNTIAFYNNMPYKWKREESHK----	594	P06786	TOP2_YEAST
547	INFIHNNWPSLLK--HGFLEEFITPIVKASKN---KQELSFYSIPEFDEWKKHIENQ----	598	Q71UH4	Q71UH4_HUMAN
521	LTLYIRFMRPVLE--AGYVYIAQPPYIKVKGSEIKEYIQPGA--DQE-----	564	F8LYS0	F8LYS0_STRTR
. : . : : : : : . * : : : : : : : : : : : : *				
586	--ARYTAKYKGLGTSTTAEGK-----EYFADMEKNIMQLT--VDARDHQLL--DSVFDA	634	A4HWL4	A4HWL4_LEIIN
586	--ARYSAKYKGLGTSTTAEGK-----EYFADMERNVMRLV--VEPKDHRL--DSVFDS	634	P27570	TOP2_CRIFA
582	--VSYTAKYKGLGTSTTAEGK-----EYFKDMDKHTMLRV--VERNDHKL--DSVFDS	630	E7LM06	E7LM06_TRYCR
566	-----K	566	D2BQ32	D2BQ32_LACLK
606	--KKWKVKYKGLGTSTTSKEAK-----EYFANMKRHRIQFKYSGPEDDAAI--SLAFSK	655	F1Q2M4	F1Q2M4_CANFA
605	--KKWKVKYKGLGTSTTSKEAK-----EYFADMKRHRIFQKYSGPEDDAAI--SLAFSK	654	Q01320	TOP2A_MOUSE
604	--KAWIKYKGLGTSTAKEAK-----EYFADMERHRILFRYAGPEDDAAI--TLAFSK	653	F7CL38	F7CL38_HORSE
569	LHISANAPAMN--ALVFEKLVAEYNSVQKLISRLSRHYPTPV-----LQGLIYQSPFIVE	621	F9GWX2	F9GWX2_HAEHA
566	LHTNAHAPALA--GEFLEKLVAEHYSVQKTIARMERKRYPRAL-----LNNLIYQPTLQEE	618	Q0W9U2	Q0W9U2_YERPE
595	--FTWKQKYKGLGTSLAQEVR-----EYFSLNDRHLKIFHSLQGNKDXYI--DLAFSK	644	P06786	TOP2_YEAST
599	--KAWIKYKGLGTSTAKEAK-----EYFADMERHRILFRYAGPEDDAAI--TLAFSK	648	Q71UH4	Q71UH4_HUMAN
565	-----E	565	F8LYS0	F8LYS0_STRTR
635	--AEVEWRKEWMTKANAF-----QGEIDID	657	A4HWL4	A4HWL4_LEIIN
635	--AEVEWRKEWMSKANAF-----QGEVDID	657	P27570	TOP2_CRIFA
631	--QEVEWRKDWMTKANAF-----TGEVDID	653	E7LM06	E7LM06_TRYCR
567	D--LQEAL	572	D2BQ32	D2BQ32_LACLK
656	--KQIDDRKEWLTHFMEDRR-----QRKLLGLPEDYLYG	687	F1Q2M4	F1Q2M4_CANFA
655	--KQVDDRKEWLTFNMEDRR-----QRKLLGLPEDYLYG	686	Q01320	TOP2A_MOUSE
654	--KKIDDRKEWLTFNMEDRR-----QRRHLGLPEQFLYG	685	F7CL38	F7CL38_HORSE
622	MMKDESAVENWGKSFQEQLTAKETEAHQYSVRTQFNAERQVYEAVITVRKHGIDTDYFLN	681	F9GWX2	F9GWX2_HAEHA
619	DLGNKEVVVTQWIDSLVLLNEKEHHGSSSYSSVVRENRRERQLFEPILRIRTHGVDTDYDLD	678	Q0W9U2	Q0W9U2_YERPE
645	--KKADDRKEWLRYEPGT-----VLD	664	P06786	TOP2_YEAST
649	--KKIDDRKEWLTFNMEDRR-----QRRHLGLPEQFLYG	680	Q71UH4	Q71UH4_HUMAN
566	K--LRAAL	571	F8LYS0	F8LYS0_STRTR
658	RSKKTTLTIPFVHKEMVHFALVGNARAIPHCV DGLK-----PSQRKILWAMLRHNS	710	A4HWL4	A4HWL4_LEIIN
658	RSKKTLLTIGDFVHKEMVHFALVGNARAIPHCV DGLK-----PSQRKILWAMLRHS	710	P27570	TOP2_CRIFA
654	RSKKTTLTVDPFVHKEMVHFALAGNARALAHAVDGLK-----PSQRKILWAIMRRSGNE	706	E7LM06	E7LM06_TRYCR
573	-----ARW	575	D2BQ32	D2BQ32_LACLK
688	QTTTYLTYNDFINKELILFSNSDERSIPSMVDGLK-----PGQRKVLFTCFKRNDR	740	F1Q2M4	F1Q2M4_CANFA
687	QSTSXYLTYNDFINKELILFSNSDERSIPSMVDGLK-----PGQRKVLFTCFKRNDR	739	Q01320	TOP2A_MOUSE
686	TATKHLTYNDFINKELILFSNSDERSIPSLVDGFK-----PGQRKVLFTCFKRNDR	738	F7CL38	F7CL38_HORSE
682	-----FDFVHGN-----EYAKIVSLNQNLGLLEEGAYVTRGEKVQPVRSFEQAV	728	F9GWX2	F9GWX2_HAEHA
679	-----FDFIHGG-----EYRKICLLGDKLRGLIEDGAFVERGERRPVSSFEALDW	725	Q0W9U2	Q0W9U2_YERPE
665	PTLKEIPISDFINKELILFSNLADNIRSIPNVLGDFK-----PGQRKVLGCGFKKLNLS	717	P06786	TOP2_YEAST
681	TATKHLTYNDFINKELILFSNSDERSIPSLVDGFK-----PGQRKVLFTCFKRNDR	733	Q71UH4	Q71UH4_HUMAN
572	-----ENY	574	F8LYS0	F8LYS0_STRTR
711	ASKVAQLSGYISEASAFHHGEASLQETIVKMAQNFTGNNINL-----LVPEGQFGSR	763	A4HWL4	A4HWL4_LEIIN
711	AAKVAQLSGYISEVSSFHHGEASLQETIVKMAQNFTGNNINL-----LVPEGQFGSR	763	P27570	TOP2_CRIFA
707	SAKVAQLSGYISEVSAFHHGEMSLQETIIMKMAQNFTGNNINL-----LIPEGQFGSR	759	E7LM06	E7LM06_TRYCR
576	A--QGRTPK-----TVQRYKGLGEMDDHQLWETTMDFEHLMAR	612	D2BQ32	D2BQ32_LACLK
741	EVKVAQLAGSVAEMSSYHHGEMSLMMTIINLAQNPFVGSNNLNL-----LQPIGQFGTR	793	F1Q2M4	F1Q2M4_CANFA
740	EVKVAQLAGSVAEMSSYHHGEMSLMMTIINLAQNPFVGSNNLNL-----LQPIGQFGTR	792	Q01320	TOP2A_MOUSE
739	EVKVAQLAGSVAEMSAHHGEQALMMTIVNLAQNPFVGSNNLNL-----LQPIGQFGTR	791	F7CL38	F7CL38_HORSE
729	LVKESRKL-----EVQRYKGLGEMNADQLWETTMDFNSRRMLK	767	F9GWX2	F9GWX2_HAEHA
726	LVKESRRGL-----AIQRYKGLGEMNPDQLWETTMDFNSRRMLR	764	Q0W9U2	Q0W9U2_YERPE
718	ELKVAQLAPYVSECTAYHHGEQSLAQTIIGLAQNPFVGSNNIYL-----LLPNAFGTR	770	P06786	TOP2_YEAST
734	EVKVAQLAGSVAEMSAHHGEQALMMTIVNLAQNPFVGSNNIYL-----LQPIGQFGTR	786	Q71UH4	Q71UH4_HUMAN
575	S--VGRSKP-----TVQRYKGLGEMDDHQLWETTMDFENRLLAR	611	F8LYS0	F8LYS0_STRTR
. : . : : : : : . * : : : : : : : : : : : : *				

764	QQLGNDHAAPRYIFTKLSRFARLLFPEDDDPLLDYMDDEGTVEPHHYVPILPMLLCNGA	823	A4HWL4	A4HWL4_LEIIN
764	QQLGNDHAAPRYIFTKLSRFARLLFPEDDDPLLDYIDEEGTMVEPNHYVPILPMLLCNGA	823	P27570	TOP2_CRIFA
760	QQLGNDHAAPRYIFTKLSLARILFPSEDEPLLDYVTEEGQQVEPNHYVPILPMLLCNGS	819	E7LM06	E7LM06_TRYCR
613	-VSVEDAAEADKIFDMLMGD-----RVEPRREFIENNAQYST----IDA-----	651	D2BQ32	D2BQ32_LACLK
794	LHGGKDSASPRYIFTMLSPLARLLFPKDDQTLKFLYDDNQVRVEPEWYIPIIPMVLINGA	853	F1Q2M4	F1Q2M4_CANFA
793	LHGGKDSASPRYIFTMLSPLARLLFPKDDHTLRFLYDDNQVRVEPEWYIPIIPMVLINGA	852	Q01320	TOP2A_MOUSE
792	LHGGKDAASPRYIFTMLSLARLLFPAVDDNLLKFLYDDNQVRVEPEWYIPIIPMVLINGA	851	F7CL38	F7CL38_HORSE
768	-VSIKDAVAADQLFTTLMGD-----EVEPRREFIENALRAAN----LDV-----	806	F9GWX2	F9GWX2_HAEHA
765	-VMVKDAIAADQLFTTLMGD-----AVEPRRAFIEENALRAAN----IDI-----	804	Q0W9U2	Q0W9U2_YERPE
771	ATGGKDAAAARYIYTELNKLTRKIFHPADDPLKYIQDEKTEVEPEWYLPILPMILVNGA	830	P06786	TOP2_YEAST
787	LHGGKDAASPRYIFTMLSLARLLFPAVDDNLLKFLYDDNQVRVEPEWYIPIIPMVLINGA	846	Q71UH4	Q71UH4_HUMAN
612	-VSVDDAAEADKIFDMLMGD-----KVEPRREFIENAVYST----LDI-----	650	F8LYS0	F8LYS0_STRTR
	.* : : *			
824	VGIGFGFATTIPSFHPLDVSAAVRAMINGESAKQVVRNLVPWAVGFGQTVRRGPDNEFIA	883	A4HWL4	A4HWL4_LEIIN
824	VGIGFGFATNIPSFHPLDVSAAVRAMINGESAKQVVRNLVPWAVGFGQTVRRGPEKEYIA	883	P27570	TOP2_CRIFA
820	VGIGFGFASNIPPFHPLDVSAAVRSMINGEAAKVVRNLVPWAVGQGEVRRGPEGEFIA	879	E7LM06	E7LM06_TRYCR
652	-----	651	D2BQ32	D2BQ32_LACLK
854	EGIGTGWSCKIPNFDIREVVNNIRRLMDGEEPL----PMLPSYKNFRGTIEELAPNQYVI	909	F1Q2M4	F1Q2M4_CANFA
853	EGIGTGWSCKIPNFDREVNNIRRLMDGEEPL----PMLPSYKNFKGTIEELASNQYVI	908	Q01320	TOP2A_MOUSE
852	EGIGTGWACKLPNYDAREIVNNVRRMLEGLDPH----PMLPNYKNFKGTIQELGQNQYAV	907	F7CL38	F7CL38_HORSE
807	-----	806	F9GWX2	F9GWX2_HAEHA
805	-----	804	Q0W9U2	Q0W9U2_YERPE
831	EGIGTGWSTYIPFPNPLEIKNIRHLMNDEELE----QMHPWFRGWTGTIEEIEPLRYRM	886	P06786	TOP2_YEAST
847	EGIGTGWACKLPNYDAREIVNNVRRMLEGLDPH----PMLPNYKNFKGTIQELGQNQYAV	902	Q71UH4	Q71UH4_HUMAN
651	-----	650	F8LYS0	F8LYS0_STRTR

884	VGKYTAHPNGRHFISEIPWMTSIEAFRLHISS--L-ASADVQRIADYSGA---NHIDID	937	A4HWL4	A4HWL4_LEIIN
884	VGKYTAHRNGRLHVSELPWMTSIEAFRSHISS--L-ASSDVQRIADYSGA---NHIDID	937	P27570	TOP2_CRIFA
880	AGSYQYVVDGRVHVTEIPWTLSEAFRDHISV--L-ASKDVQRIADYSGA---NHVDID	933	E7LM06	E7LM06_TRYCR
652	-----	651	D2BQ32	D2BQ32_LACLK
910	SGEVAIILNSTTIEISELPVRTWTQTYKEQVLEPMLNGTEKTPPLITDYREYHTDTTVKFV	969	F1Q2M4	F1Q2M4_CANFA
909	NGEVAIILNSTTIEISELPVRTWTQTYKEQVLEPMLNGTEKTPSLITDYREYHTDTTVKFV	968	Q01320	TOP2A_MOUSE
908	SGEIFVDRNTVEITELPVRTWTQTYKEQVLEPMLNGTDKTPALISDYKEYHTDTTVKFV	967	F7CL38	F7CL38_HORSE
807	-----	806	F9GWX2	F9GWX2_HAEHA
805	-----	804	Q0W9U2	Q0W9U2_YERPE
887	YGRIEQIGDNVLEITELPARTWTSTIKEYLLLG--LSGNDKIKPWIKDMEEQHD--DNIKFI	944	P06786	TOP2_YEAST
903	SGEIFVDRNTVEITELPVRTWTQTYKEQVLEPMLNGTDKTPALISDYKEYHTDTTVNSV	962	Q71UH4	Q71UH4_HUMAN
651	-----	650	F8LYS0	F8LYS0_STRTR

938	LIVRDGSLTTW--AECETDLALAQRI-YINGTVFSPTGTLSPIDSDLPVLQWHYDRRLD	994	A4HWL4	A4HWL4_LEIIN
938	LIVREGSMTTW--AECETDLALSQRI-YINGTVFSPTGTLSPIDADSLPVLQWHYDRRLD	994	P27570	TOP2_CRIFA
934	LELTNGAMTTY--AECESLSLTQRI-YINGTVFSPTGVLTPLEGDLAPVLQWHYDRRLD	990	E7LM06	E7LM06_TRYCR
652	-----	651	D2BQ32	D2BQ32_LACLK
970	VKMTEEKLAEEAERVGLHKVFKLQTSITCNSMVLFDHVGCLKKYDT-VLDILRDFEFELRLK	1028	F1Q2M4	F1Q2M4_CANFA
969	IKMTEEKLAEEAERVGLHKVFKLQSSITCNSMVLFDHVGCLKKYDT-VLDILRDFEFELRLK	1027	Q01320	TOP2A_MOUSE
968	VKMTEEKLAQAEAAAGLHKVFKLQTTITCNSMVLFDHMGCLKKYET-VQDILKEFFDLRLS	1026	F7CL38	F7CL38_HORSE
807	-----	806	F9GWX2	F9GWX2_HAEHA
805	-----	804	Q0W9U2	Q0W9U2_YERPE
945	ITLSPEEMAKTRKIGFYERFKLISPISLMNMVAFDPHGKIKKYN--VNEILSEFYVRL	1003	P06786	TOP2_YEAST
963	VKMTEEKLAQAEAAAGLHKVFKLQTTITCNSMVLFDHMGCLKKYET-VQDILKEFFDLRLS	1021	Q71UH4	Q71UH4_HUMAN
651	-----	650	F8LYS0	F8LYS0_STRTR

995	LYKRRRTKIGLMEMDLARLQSTRKFVEHFRQGQIDFLN-ATDDTLHKTCV-----	1044	A4HWL4	A4HWL4_LEIIN
995	LYKRRRTQIGLEMDLARLQSTRKFVEHFRQGHIDFLA-ATDDTLTKTCV-----	1044	P27570	TOP2_CRIFA
991	LYKRRQRNLGLLEAEAREKSTLKFVTHFREGKIDIVN-ATDDSLAKTCS-----	1040	E7LM06	E7LM06_TRYCR
652	-----	651	D2BQ32	D2BQ32_LACLK
1029	YYGLRKEWLLGMLGAESAKLNNQARFILEKIDGKIIIVENKPKKELIKVLIQRGYSDP-	1087	F1Q2M4	F1Q2M4_CANFA
1028	YYGLRKEWLLGMLGAESSKLNNQARFILEKIDGKIV-IENKPKKELIKVLIQRGYSDP-	1085	Q01320	TOP2A_MOUSE
1027	YYGLRKEWLVGMLGAESTKLNNQARFILEKIQGKIT-IENRSKKDLIQLVQRGYSDP-	1084	F7CL38	F7CL38_HORSE
807	-----	806	F9GWX2	F9GWX2_HAEHA
805	-----	804	Q0W9U2	Q0W9U2_YERPE
1004	YYQKRKDHMSERLQWEVEKYSFQVKFIKMIIEKELT-VTNKPRNAIQELENLGFPRFNK	1062	P06786	TOP2_YEAST
1022	YYGLRKEWLVGMLGAESTKLNNQARFILEKIQGKIT-IENRSKKDLIQLVQRGYSDP-	1079	Q71UH4	Q71UH4_HUMAN
651	-----	650	F8LYS0	F8LYS0_STRTR

1045	-----KLGLVRVDESFDYILKKPIT	1064	A4HWL4	A4HWL4_LEIIN
1045	-----KLGLVRVDDGYDYILKKPIT	1064	P27570	TOP2_CRIFA
1041	-----KLGMVRVDDSDYDYVLRKPIT	1060	E7LM06	E7LM06_TRYCR
652	-----	651	D2BQ32	D2BQ32_LACLK
1088	-----VKAWKEAQ--QKVPDEEENEESDNENEAEKSDSVRDSGPTFNLLDMPLW	1135	F1Q2M4	F1Q2M4_CANFA
1086	-----VKAWKEAQ--QKVPDEEENEESDTET--STSDSAAEAGPTFNLLDMPLW	1131	Q01320	TOP2A_MOUSE
1085	-----VKAWKEAQ--EKAAEEETQ--NQHDDSSSDSGTSPGPDFNYILNMSLW	1129	F7CL38	F7CL38_HORSE
807	-----	806	F9GWX2	F9GWX2_HAEHA
805	-----	804	Q0W9U2	Q0W9U2_YERPE
1063	EKGPPYYSNPDEIAEQINDVKGATSDEEDEESSHEDTENVINGPEELYGTIEYLLGMRIW	1122	P06786	TOP2_YEAST
1080	-----VKAWKEAQ--EKAAEEDETQ--NQHDDSSSDSGTSPGPDFNYILNMSLW	1124	Q71UH4	Q71UH4_HUMAN
651	-----	650	F8LYS0	F8LYS0_STRTR

1065	FFTRTSTEKLQADIATQAQIEELKRTTPVKMWLTDLKDFDKTFQEYERVLINSIQKEQR	1124	A4HWL4	A4HWL4_LEIIN
1065	FYTKTSTEKLQADIKTQDSIAVLKQTTTPVKMWLTDLKDFDKTFQEYERVLHSIQKEQR	1124	P27570	TOP2_CRIFA
1061	FYTKTSLLENLRKISETEKRIDKLKKTAPVQMWLDELDRFDRAFEHEKTAVATILKERR	1120	E7LM06	E7LM06_TRYCR
652	-----	651	D2BQ32	D2BQ32_LACLK
1136	YLTKEKKDELCKLRNEKEQELETLLKRKSPDLWKEDLATFVEELEAVETKEKQEEQIGLP	1195	F1Q2M4	F1Q2M4_CANFA
1132	YLTKEKKDELCKQRNEKEQELNTLKQKSPDLWKEDLAVFIEELVVEAKEQDEQVGLP	1191	Q01320	TOP2A_MOUSE
1130	SLTKEKVEELIKQRDAKGREVNDLKRKSPDLWKEDLAADFVEELDKVEAQEREDILAGMA	1189	F7CL38	F7CL38_HORSE
807	-----	806	F9GWX2	F9GWX2_HAEHA
805	-----	804	Q0W9U2	Q0W9U2_YERPE
1123	SLTKERYQKLLKQKQEKETELNLLKLSAKDIWNTDLKAFVGYQEFQORDAEARGGNVP	1182	P06786	TOP2_YEAST
1125	SLTKEKVEELIKQRDAKGREVNDLKRKSPDLWKEDLAADFVEELDKVESQEREDVLGMS	1184	Q71UH4	Q71UH4_HUMAN
651	-----	650	F8LYS0	F8LYS0_STRTR
1125	SSSITGGVELPALRQPLMLLE---ASAKGA---TAYRVHACQ-----Y	1161	A4HWL4	A4HWL4_LEIIN
1125	PASITGGEEVPALRQPLMLLE---APAKGAASSSYRVHICR-----Y	1163	P27570	TOP2_CRIFA
1121	VNPPTGDVVS---RNLLQPRLEEEVVKVSSSGGKSVPMRVVRVK-----Y	1161	E7LM06	E7LM06_TRYCR
652	-----	651	D2BQ32	D2BQ32_LACLK
1196	GKGGKGK---GKKT---QM-AEVLPSPCGKRVIPIRV-----TIEMKA	1230	F1Q2M4	F1Q2M4_CANFA
1192	GKAGKAK---GKKA---QMCADVLSPRGKRVIPIQV-----TVEMKA	1227	Q01320	TOP2A_MOUSE
1190	GKAIKGK---VGKPKVKKLQLEETMPSYGRRVVPEI-----TAM-KA	1228	F7CL38	F7CL38_HORSE
807	-----	806	F9GWX2	F9GWX2_HAEHA
805	-----	804	Q0W9U2	Q0W9U2_YERPE
1183	NKGSKTGKGGKRLVD---DEDYDPSKKNKSTARKGKKIKLEDKNFERILLEQKLVTKS	1239	P06786	TOP2_YEAST
1185	GKAIKGK---VGKPKVKKLQLEETMPSYGRRIIPEI-----TAM-KA	1223	Q71UH4	Q71UH4_HUMAN
651	-----	650	F8LYS0	F8LYS0_STRTR
1162	EKPPPSKRRPG-----ESVGGARPSDSAARTVGKRLVGSRSVFKNKKP---MS	1206	A4HWL4	A4HWL4_LEIIN
1164	EEPPASKRKPE-----DTYGGALSSGGSTRNVGKRLTGARGAKK---KK--VV	1206	P27570	TOP2_CRIFA
1162	VPPPPSKRPHV-----GQSVGGGG---GGSVRSSAAAVVAH---VKAEEK---A-	1201	E7LM06	E7LM06_TRYCR
652	-----	651	D2BQ32	D2BQ32_LACLK
1231	EAEEKIKYLKG-----NENTEGSPQEEI---EI---EGL-KQRLEKKQK	1268	F1Q2M4	F1Q2M4_CANFA
1228	EAEEKIRKKIK-----SENVEGTPAEDGA---EP---GSL-RQRIEKKQK	1265	Q01320	TOP2A_MOUSE
1229	DASKKLLKKKGGDLDTAVKVEFDEEFGSTPVESTG---EEALIPPTSINKGPKPKREK	1284	F7CL38	F7CL38_HORSE
807	-----	806	F9GWX2	F9GWX2_HAEHA
805	-----	804	Q0W9U2	Q0W9U2_YERPE
1240	KAPTIIKKEKTPSVSET---KTEEEENAPSSTS-----SSSIFDI---KKED	1280	P06786	TOP2_YEAST
1224	DASKKLLKKKGGDLDTAAVKVEFDEEFGAPVEGAG---EEALTPSVPIKNGPKPKREK	1279	Q71UH4	Q71UH4_HUMAN
651	-----	650	F8LYS0	F8LYS0_STRTR
1207	RKNNVK-----VSLSTRVAQFAGAQLGRLLPHVLM-----	1236	A4HWL4	A4HWL4_LEIIN
1207	RRTRTK-----MSLGRVAEFAGAQLGRLLPQLPR-----	1236	P27570	TOP2_CRIFA
1202	---ARA---RSMQKMLLDVVARQVARVLPRLPW-----	1228	E7LM06	E7LM06_TRYCR
652	-----	651	D2BQ32	D2BQ32_LACLK
1269	REPGTK-----TKQTTLPEFK---PIKKGKKRNPWSDSESDMSSNESN---FDVPPREV	1316	F1Q2M4	F1Q2M4_CANFA
1266	KEPGAK-----KQTTLPEFK---PVKKGKKRNPWSDSESDVSSNESN---VDVPPRQK	1311	Q01320	TOP2A_MOUSE
1285	KEPGTR-----VRKTPPTSSGKS---SAKKVKKRNPWSDSESDLEETEPVVIIPRDSL	1336	F7CL38	F7CL38_HORSE
807	-----	806	F9GWX2	F9GWX2_HAEHA
805	-----	804	Q0W9U2	Q0W9U2_YERPE
1281	KDEGELSKISNFKKISTIFDKMGSTSATSSENTPEQDDVATKKNQTTAKKTAVKPK---	1337	P06786	TOP2_YEAST
1280	KEPGTR-----VRKTPPTSSGKP---SAKKVKKRNPWSDSESDLEETEPVVIIPRDSL	1331	Q71UH4	Q71UH4_HUMAN
651	-----	650	F8LYS0	F8LYS0_STRTR
1237	-----	1236	A4HWL4	A4HWL4_LEIIN
1237	-----LLF-----	1239	P27570	TOP2_CRIFA
1229	-----FLF-----	1231	E7LM06	E7LM06_TRYCR
652	-----	651	D2BQ32	D2BQ32_LACLK
1317	EPRAATKTFTVDLDDSDSDFEERIQ-----DEDSVPSDV---	1354	F1Q2M4	F1Q2M4_CANFA
1312	EQRSAAAKAKFTVDLDDSDSDFGLDEKDE-----DEDLPLDA---	1349	Q01320	TOP2A_MOUSE
1337	LRRAAERPXYTFDFSEEEEDADD-DDDNDNLEELVKASPITNDGEDEFVPSDGLDKD	1395	F7CL38	F7CL38_HORSE
807	-----	806	F9GWX2	F9GWX2_HAEHA
805	-----	804	Q0W9U2	Q0W9U2_YERPE
1338	LAKKPVKQKQVVELSGESDLEILDSTYTDRED-----SNKDEDDAIPQRSRRQ---	1385	P06786	TOP2_YEAST
1332	LRRAAERPXYTFDFSEEEEDDDDDDDNDNLEELVKASPITNDGEDEFVPSDGLDKD	1391	Q71UH4	Q71UH4_HUMAN
651	-----	650	F8LYS0	F8LYS0_STRTR
1237	-----	1236	A4HWL4	A4HWL4_LEIIN
1240	-----	1239	P27570	TOP2_CRIFA
1232	-----	1231	E7LM06	E7LM06_TRYCR
652	-----	651	D2BQ32	D2BQ32_LACLK
1355	----SPHKTASPKRTAKELKPKQSA-----PPV-----MDLDADDAKDSVPLSP	1395	F1Q2M4	F1Q2M4_CANFA
1350	----TPPKAKIPPKNKTKALKTQGS-----MSV-----VDLES-DVKDSVPASP	1389	Q01320	TOP2A_MOUSE
1396	EYTFSPGKSKAIPEKSSHDKKTQDFGNLFSFSPYSQKS---EDDSAKFDSNEEDSASVFSP	1453	F7CL38	F7CL38_HORSE
807	-----	806	F9GWX2	F9GWX2_HAEHA
805	-----	804	Q0W9U2	Q0W9U2_YERPE
1386	----RSSRAASVPKKSIVETLE-----LSDDSFIEDDEENQGSVDVSFNEED---	1428	P06786	TOP2_YEAST
1392	EYTFSPGKSKASPEKSLHDKKSQDFGNLFSFSPYSQKS---EDDSAKFDSNEEDSASVFSP	1449	Q71UH4	Q71UH4_HUMAN
651	-----	650	F8LYS0	F8LYS0_STRTR

1237	-----	1236	A4HWL4	A4HWL4_LEIIN
1240	-----	1239	P27570	TOP2_CRIFA
1232	-----	1231	E7LM06	E7LM06_TRYCR
652	-----	651	D2BQ32	D2BQ32_LACLK
1396	GSTA-DFLAETIIVNPLPKKKVDVKKIAPKSQSSTSTTGAKKRAAPKGTKKDPGLNSD--	1452	F1Q2M4	F1Q2M4_CANFA
1390	GVPAADFFPAETEQSK-PSKKTGVGKKTATKSQSSVSTAGTKKRAAPKGTKSDSALSAR--	1446	Q01320	TOP2A_MOUSE
1454	S-----FGL--KQTDKVPSKTVAACKGKPSS-----DTTPKPKRTPKAKK-VETVNSDSD	1500	F7CL38	F7CL38_HORSE
807	-----	806	F9GWX2	F9GWX2_HAEHA
805	-----	804	Q0W9U2	Q0W9U2_YERPE
1429	-----	1428	P06786	TOP2_YEAST
1450	S-----FGL--KQTDKVPSKTVAACKGKPSS-----DTVPKPKRAPKQKKVVEAVNSDSD	1497	Q71UH4	Q71UH4_HUMAN
651	-----	650	F8LYS0	F8LYS0_STRTR
1237	-----	1236	A4HWL4	A4HWL4_LEIIN
1240	-----	1239	P27570	TOP2_CRIFA
1232	-----	1231	E7LM06	E7LM06_TRYCR
652	-----	651	D2BQ32	D2BQ32_LACLK
1453	----VSQKPDPPKT--KNHRKRKPSTSDS-SDSNFEKMISKAAT-----NKKSKESED	1499	F1Q2M4	F1Q2M4_CANFA
1447	----VSEKPAPAKA--KNSRKRKPSSSDS-SDSDFERAISKGAT-----SKKAKGEEQD	1493	Q01320	TOP2A_MOUSE
1501	SEFGIPKKTTPKGKGRGAKKRKASGENEGDYNPGRKTSKPASKKPKKTSFDQSDVDI	1560	F7CL38	F7CL38_HORSE
807	-----	806	F9GWX2	F9GWX2_HAEHA
805	-----	804	Q0W9U2	Q0W9U2_YERPE
1429	-----	1428	P06786	TOP2_YEAST
1498	SEFGIPKKTTPKGKGRGAKKRKASGENEGDYNPGRKTSKTSKKPKKTSFDQSDVDI	1557	Q71UH4	Q71UH4_HUMAN
651	-----	650	F8LYS0	F8LYS0_STRTR
1237	-----	1236	A4HWL4	A4HWL4_LEIIN
1240	-----	1239	P27570	TOP2_CRIFA
1232	-----	1231	E7LM06	E7LM06_TRYCR
652	-----	651	D2BQ32	D2BQ32_LACLK
1500	FHLDLDSGVAPRAKSGRARKPIKYLEESDEDDLF-----	1533	F1Q2M4	F1Q2M4_CANFA
1494	FPVDLEDTIAPRAKSDRARKPIKYLEESDDDDDLF-----	1528	Q01320	TOP2A_MOUSE
1561	FPSDFTSEPPSLPRTGRARKEVKYFAESDEE-EDVDFAMFN	1600	F7CL38	F7CL38_HORSE
807	-----	806	F9GWX2	F9GWX2_HAEHA
805	-----	804	Q0W9U2	Q0W9U2_YERPE
1429	-----	1428	P06786	TOP2_YEAST
1558	FPSDFTSEPPSLPRTGRARKEVKYFAESDEEEDDVDFAMFN	1598	Q71UH4	Q71UH4_HUMAN
651	-----	650	F8LYS0	F8LYS0_STRTR

Anexo 2 – Alinhamento múltiplo das sequências aminoacídicas, destacando-se com uma gradação a cinzento, as zonas de maior semelhança entre as seguintes espécies de *Leishmania*: *Leishmania infantum* (A4HWL4), *L. donovani* (estirpe BPK282A1) (E9BCH0), *L. chagasi* (O61078), *L. major* (Q4QF53), *L. mexicana* (estirpe MHOM/GT/2001/U1103) (E9AQC1), *L. braziliensis* (A4H891).

1	MTDASKYKKLTPIDHVLLRPEMYVGS	60	A4HWL4	A4HWL4_LEIIN
1	MTDASKYKKLTPIDHVLLRPEMYVGS	60	E9BCH0	E9BCH0_LEIDB
1	MTYASKYKKLTPIDHVLLRPEMYVGS	60	O61078	TOP2_LEICH
1	MTDASKYKKLTPIDHVLLRPEMYVGS	60	Q4QF53	Q4QF53_LEIMA
1	MTDASKYKKLTPIDHVLLRPEMYVGS	60	E9AQC1	E9AQC1_LEIMU
1	MTDASKYKKLSPIDHVLLRPEMYVGS	60	A4H891	A4H891_LEIBR
** *****:*****:*****:*****:*****				
61	EILLNAADNINNSKGSVRQTYISIHIS	120	A4HWL4	A4HWL4_LEIIN
61	EILLNAADNINNSKGSVRQTYISIHIS	120	E9BCH0	E9BCH0_LEIDB
61	EILLNAADNINNSKGSVRQTYISIHIS	120	O61078	TOP2_LEICH
61	EILLNAADNINNSKGSVRQTYINIHIS	120	Q4QF53	Q4QF53_LEIMA
61	EILLNAADNINNSKGSVRQTYISINIS	120	E9AQC1	E9AQC1_LEIMU
61	EILLNAADNINNSKGSVRQTYISISIS	120	A4H891	A4H891_LEIBR
*****:*****:*****:*****:*****				
121	LLTSSNYNNDSTSTTAGRHGYGAKLT	180	A4HWL4	A4HWL4_LEIIN
121	LLTSSNYNNDSTSTTAGRHGYGAKLT	180	E9BCH0	E9BCH0_LEIDB
121	LLTSSNYNNDSTSTTAGRHGYGAKLT	180	O61078	TOP2_LEICH
121	LLTSSNYNNDSTSTTAGRHGYGAKLT	180	Q4QF53	Q4QF53_LEIMA
121	LLTSSNYNNDSTSTTAGRHGYGAKLT	180	E9AQC1	E9AQC1_LEIMU
121	LLTSSNYNNDSTSTTAGRHGYGAKLT	180	A4H891	A4H891_LEIBR
*****:*** **				
181	NRVDPKEKNVTRVKFMPDYAHFGFP	240	A4HWL4	A4HWL4_LEIIN
181	NRVDPKEKNVTRVKFMPDYAHFGFP	240	E9BCH0	E9BCH0_LEIDB
181	NRVDPKEKSVTRVKFMPDYAHFGFP	240	O61078	TOP2_LEICH
181	NRVDPKEKNVTRVKFMPDYAHFGFP	240	Q4QF53	Q4QF53_LEIMA
181	NRVDPKEKNVTRVKFMPDYAHFGFP	240	E9AQC1	E9AQC1_LEIMU
181	SRVDPKEKNVTRVKFMPDYAHFGFP	240	A4H891	A4H891_LEIBR
.*****:*****:*****:*****:*****				
241	GFRTFTDYARLYSLPGLDGSMPPEP	300	A4HWL4	A4HWL4_LEIIN
241	GFRTFTDYARLYSLPGLDGSMPPEP	300	E9BCH0	E9BCH0_LEIDB
241	GFRTFTDYARLYSLPGLDGSMPPEP	300	O61078	TOP2_LEICH
241	GFRTFTDYAGLYSLPGLDGSMPPEP	300	Q4QF53	Q4QF53_LEIMA
241	GFRSFTDYARLYSLGLDGSMPPEP	300	E9AQC1	E9AQC1_LEIMU
241	GFETFTDYARLYSLPGLDGSMPPEP	300	A4H891	A4H891_LEIBR
.:*** ***:**.:** *****:*** *****:*****:*****				

301	GTHCNAAMDILDSCLDSLAKNFKNKGKVVDTNRVQRHFTVLVFLIQTQPKFDSQSQRKLV	360	A4HWL4	A4HWL4_LEIIN
301	GTHCNAAMDILDSCLDSLAKNFKNKGKVVDTNRVQRHFTVLVFLIQTQPKFDSQSQRKLV	360	E9BCH0	E9BCH0_LEIDB
301	GTHCNAAMDILDSCLDSLAKNFKNKGKVVDTNRVQRHFTVLVFLIQTQPKFDSQSQRKLV	360	O61078	TOP2_LEICH
301	GTHCNAAMDILDSCLDSLAKNFKNKGKVVDTNRVQRHFTVLVFLVQAQPKFDSQSQRKLV	360	Q4QF53	Q4QF53_LEIMA
301	GTHCNAAMDILDSCLDSLAKNFKNKGKVVDTNRVQRHFTVLVFLVQAQPKFDSQSQRKLV	360	E9AQC1	E9AQC1_LEIMU
301	GTHCNAAMDILDSCLDSLAKNFKNKGKVVDTNRVQRHFTVLVFLIQAQPKFDSQSQRKLV	360	A4H891	A4H891_LEIBR
*****:****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****				
361	STVTMPRPVKNTLEKYLERMPFLEAHVNSMDDQLANELNKEIGAGRLLSSKTLISAITKL	420	A4HWL4	A4HWL4_LEIIN
361	STVTMPRPVKNTLEKYLERMPFLEAHVNSMDDQLANELNKEIGAGRLLSSKTLISAITKL	420	E9BCH0	E9BCH0_LEIDB
361	STVTMPRPVKNTLEKYLERMPFLEAHVNSMDDQLANELNKEIGAGRLLSSKTLISAITKL	420	O61078	TOP2_LEICH
361	STVTMPRPVKNTLEKYLERMPFLEAHVNSMDDQLTNELNKEIGAGRLLSSKTLISSITKL	420	Q4QF53	Q4QF53_LEIMA
361	STVTMPRPVKNTLEKYLERMPFLEAHVNSMDDQLTNELNKEIGAGRLLSSKTLISSITKL	420	E9AQC1	E9AQC1_LEIMU
361	STVTMPRPVKNTLEKYLETMPFLEAHVNSMDDQLANELNKEIGAGRLLSSKTLISSITKL	420	A4H891	A4H891_LEIBR
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****				
421	VDATSSRPDGRNIRTLIITEGDSAKALALNSLSSEQKKYCGVFLRGKLLNVRNKNLKR	480	A4HWL4	A4HWL4_LEIIN
421	VDATSSRPDGRNIRTLIITEGDSAKALALNSLSSEQKKYCGVFLRGKLLNVRNKNLKR	480	E9BCH0	E9BCH0_LEIDB
421	VDATSSRPDGRNIRTLIITEGDSAKALALNSLSSEQKKYCGVFLRGKLLNVRNKNLKR	480	O61078	TOP2_LEICH
421	VDATSSRPDGRNIRTLIITEGDSAKALALNSLSSEQKKYCGVFLRGKLLNVRNKNLKR	480	Q4QF53	Q4QF53_LEIMA
421	VDATSSRPDGRNIRTLIITEGDSAKALALNSLSSEQKKYCGVFLRGKLLNVRNKNLKR	480	E9AQC1	E9AQC1_LEIMU
421	VDATSSRPDGRNIRTLIITEGDSAKALALNSLSSEQKKYCGVFLRGKLLNVRNKNLKR	480	A4H891	A4H891_LEIBR
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****				
541	KTCKELQDLFSLGLEGKEYRSPAELRYQRLVMTDQDADGSHIKGLVINAFESLWPKL	540	A4HWL4	A4HWL4_LEIIN
541	KTCKELQDLFSLGLEGKEYRSPAELRYQRLVMTDQDADGSHIKGLVINAFESLWPKL	540	E9BCH0	E9BCH0_LEIDB
541	KTCKELQDLFSLGLEGKEYRSPAELRYQRLVMTDQDADGSHIKGLVINAFESLWPKL	540	O61078	TOP2_LEICH
541	KTCKELQDLFSLGLEGKEYRSPAELRYQRLVMTDQDADGSHIKGLVINAFESLWPKL	540	Q4QF53	Q4QF53_LEIMA
541	KTCKELQDLFSLGLEGKEYRTLAELRYQRLVMTDQDADGSHIKGLVINAFESLWPKL	540	E9AQC1	E9AQC1_LEIMU
541	KMCKELQDLFLALGLEGKEYRTPDELRYQRLVMTDQDADGSHIKGLVINAFESLWPTL	540	A4H891	A4H891_LEIBR
* ** *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****				
541	LQNNPGYISLSTPIVLIKVSQKSKEVIAFHSFRDFHRWQRAHPSARYTAKYKGLGTST	600	A4HWL4	A4HWL4_LEIIN
541	LQNNPGYISLSTPIVLIKVSQKSKEVIAFHSFRDFHRWQRAHPSARYTAKYKGLGTST	600	E9BCH0	E9BCH0_LEIDB
541	LQNNPGYISLSTPIVLIKVSQKSKEVIAFHSFRDFHRWQRAHPSARYTAKYKGLGTST	600	O61078	TOP2_LEICH
541	LQNNPGYISLSTPIVLIKVSQKSKEVIAFHSFRDFHRWQRAHPSARYTAKYKGLGTST	600	Q4QF53	Q4QF53_LEIMA
541	LQNNPGYISLSTPIVLIKVSQKSKEVIAFHSFRDFHRWQRAHPSARYTAKYKGLGTST	600	E9AQC1	E9AQC1_LEIMU
541	LQNNPGYISLSTPIVLIKVSQKSKEVIAFHSFRDFHRWQRAHPTARYTAKYKGLGTST	600	A4H891	A4H891_LEIBR
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****				
601	TAEGKEYFADMEKNIMQLTVDARDHQLLDSVFDAAEVEWRKEWMTKANAFQGEIDIDRSK	660	A4HWL4	A4HWL4_LEIIN
601	TAEGKEYFADMEKNIMQLTVDARDHQLLDSVFDAAEVEWRKEWMTKANAFQGEIDIDRSK	660	E9BCH0	E9BCH0_LEIDB
601	TAEGKEYFADMEKNIMQLTVDARDHQLLDSVFDAAEVEWRKEWMTKANAFQGEIDIDRSK	660	O61078	TOP2_LEICH
601	TAEGKEYFADMEKNIMQLTVDARDHQLLDSVFDAAEVEWRKEWMTKANAFQGEVDIDRSK	660	Q4QF53	Q4QF53_LEIMA
601	TAEGKEYFADMEKNIMQLTVDARDHQLLDSVFDAAEVEWRKEWMTKANAFQGEIDIDRSK	660	E9AQC1	E9AQC1_LEIMU
601	TAEGKEYFADMEKNIMRLTVDADKQHLDSVFDAAEVEWRKEWMTKANAFQGEIDIDRSK	660	A4H891	A4H891_LEIBR
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****				
661	KTLTIPEFVHKEMVHFALVGNARAIPHCVDGLKPSQRKILWAMLRHNSSEASKVAQLSGY	720	A4HWL4	A4HWL4_LEIIN
661	KTLTIPEFVHKEMVHFALVGNARAIPHCVDGLKPSQRKILWAMLRHNSSEASKVAQLSGY	720	E9BCH0	E9BCH0_LEIDB
661	KTLTIPEFVHKEMVHFALVGNARAIPHCVDGLKPSQRKILWAMLRHNSSEASKVAQLSGY	720	O61078	TOP2_LEICH
661	KTLTIPEFVHKEMVHFALVGNARAIPHCVDGLKPSQRKILWAMLRHNSSEASKVAQLSGY	720	Q4QF53	Q4QF53_LEIMA
661	KMLTIPEFVHKEMVHFALVGNARAIPHCVDGLKPSQRKILWAMLRHNSSEASKVAQLSGY	720	E9AQC1	E9AQC1_LEIMU
661	KSLTIPEFVHKEMVHFALVGNARAIPHCVDGLKPSQRKILWAMLRHNSSEASKVAQLSGY	720	A4H891	A4H891_LEIBR
* *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****				
721	ISEASAFHHGEASLQETIVKMAQNFTGGNNINLLVPEQGFGSRQQLGNDHAAPRYIFTKL	780	A4HWL4	A4HWL4_LEIIN
721	ISEASAFHHGEASLQETIVKMAQNFTGGNNINLLVPEQGFGSRQQLGNDHAAPRYIFTKL	780	E9BCH0	E9BCH0_LEIDB
721	ISEASAFHHGEASLQETIVKMAQNFTGGNNINLLVPEQGFGSRQQLGNDHAAPRYIFTKL	780	O61078	TOP2_LEICH
721	ISEASAFHHGEASLQETIVKMAQNFTGGNNINLLVPEQGFGSRQQLGSDHAAPRYIFTKL	780	Q4QF53	Q4QF53_LEIMA
721	ISEASAFHHGEASLQETIVKMAQNFTGGNNINLLVPEQGFGSRQQLGSDHAAPRYIFTKL	780	E9AQC1	E9AQC1_LEIMU
721	ISEASAFHHGEVSLQETIVKMAQNFTGGNNINLLVPEQGFGSRQQLGNDHAAPRYIFTKL	780	A4H891	A4H891

